

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 0 年 4 月 2 6 日  
Date of Application:

出 願 番 号 平成 1 2 年 特 許 願 第 1 2 6 6 2 3 号  
Application Number:

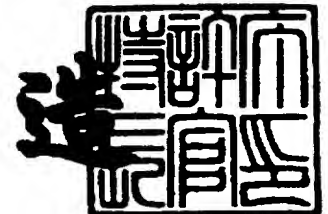
出 願 人 寒 川 賢 治  
Applicant (s):

Best Available Copy

2 0 0 1 年 2 月 2 0 日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



【書類名】 特許願

Printed: 02-03-2002

PRIDOC-X

00946453-JP000490

【整理番号】 DS03J180

【提出日】 平成12年 4月26日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】

C07K 14/60

C12N 15/16

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市小野原東6丁目28、4-201号

【氏名】 寒川 賢治

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊中市西緑丘1丁目5-1、302号

【氏名】 児島 将康

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府箕面市西宿2丁目12-12、藤和箕面ホームズA808号

【氏名】 細田 洋司

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市東灘区西岡本6丁目4-24, 204号

【氏名】 松尾 壽之

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県邑楽郡千代田町大字赤岩字くらかけ2716番地1  
サントリー株式会社医薬センター内

【氏名】 南竹 義春

【特許出願人】

【識別番号】 593081475

【氏名又は名称】 寒川 賢治

【代理人】

【識別番号】 100077012

【登録主】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【電話番号】 06-4796-1300

【先の出願に基づく優先権の主張】

【出願番号】 平成11年特許願第210002号

【出願日】 平成11年 7月23日

【先の出願に基づく優先権の主張】

【出願番号】 平成11年特許願第338841号

【出願日】 平成11年11月29日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 066372

【納付金額】 21,000

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 2】 (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求項 1 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 3】 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22、23、25 及び 26 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求項 2 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 4】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドの (a) 構成アミノ酸が修飾されているか又はされていない、かつ (b) 少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により置換されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 5】 配列番号 27 記載のアミノ酸配列を有する請求項 1 又は 4 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

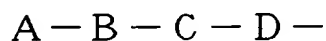
【請求項 6】 (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む請求項 4 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 7】 配列番号 3、4、5、8、9、10、11、12、13、1



群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する請求項 6 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 8】 アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が、下記の式で表される請求項 1 又は 4 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。



A；アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

B；アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

(ただし、A+B の分子鎖長がジペプチド相当長ある。)

C 又は D；同一であっても異なってもよく、(a) 修飾されたアミノ酸、又は (b) 疎水性側鎖を有するアミノ酸、を表す。

【請求項 9】 配列番号 2、3、8、9、10、11、16、17、22、25 及び 26 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が請求項 8 に記載のペプチド系化合物であるペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 10】 修飾アミノ酸が、アミノ酸の  $\alpha$  炭素に、(a) 炭素数 1 以上のアルキレン基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が 1 若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は (b) 炭素数 1 以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したアミノ酸である請求項 1 乃至 9 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 11】 アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより修飾された修飾アミノ酸を有する請求項 1 乃至 10 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 12】 アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸がエステル結合したアミノ酸を有する請求項 11 記載のペプチド系化合物又はその薬

【請求項 13】 脂肪酸が炭素数 2 乃至 5 である請求項 12 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 14】 脂肪酸が炭素数 2、4、6、8、10、12、14、16 および 18 の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である請求項 12 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 15】 脂肪酸がオクタン酸 (octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求項 12 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 16】 脂肪酸がデカン酸 (decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である請求項 12 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【請求項 17】 アミノ末端のアミノ基が、炭素数 1 以上の飽和あるいは不飽和アルキル基又はアシル基の導入により修飾され及び／又はカルボキシル末端のカルボキシル基の OH が OZ 又は NR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> (Z は薬学的に許容し得る陽イオン又は低級に分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R<sub>2</sub> 及び R<sub>3</sub> は H 及び低級に分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す。)であることを特徴とする請求項 1 乃至 16 項記載のペプチド系化合物。

【請求項 18】 請求項 1 乃至 16 記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端に、更に塩基性アミノ酸が結合していることを特徴とするペプチド系化合物。

【請求項 19】 請求項 1 乃至 16、又は 18 記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とするペプチド系化合物。

【請求項 20】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物。

【請求項 21】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項 22】 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための医薬組成物。

【請求項 23】 ヒト以外の動物に適用するための請求項 20 乃至 22 記載の医薬組成物。

【請求項 24】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

【請求項 25】 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。

【請求項 26】 ヒト以外の動物に適用するための請求項 24 又は 25 記載の治療方法。

【請求項 27】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA であって、当該 DNA がコードするアミノ酸配列中に、少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該 DNA。

【請求項 28】 塩基配列が、配列番号 6、7、14、15、20、21 および 24 記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列である請求項 27 記載の DNA。

【請求項 29】 塩基配列が、配列番号 6、7、14、15、20、21 および 24 記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である請求項 27 記載の DNA。

【請求項 30】 請求項 27 乃至 29 記載の DNA を有するベクター。

【請求項 31】 請求項 30 記載のベクターを含有する細胞。

【請求項 32】 請求項 27 乃至 29 記載の DNA を有するベクターを有し、且つ当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該ア

【請求項 33】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物に対する抗体

【請求項 34】 請求項 33 記載の抗体を用いて請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物のアッセイ方法。

【請求項 35】 請求項 33 記載の抗体を用いて請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物の検出用キット。

【請求項 36】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求項 27 乃至 29 記載の DNA を含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物の製造方法。

【請求項 37】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、請求項 27 乃至 29 記載の DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物の製造方法。

【請求項 38】 請求項 12 乃至 16 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸をエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求項 12 乃至 16 記載のペプチド系化合物の製造方法。

【請求項 39】 配列番号 8 記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする請求項 12 乃至 16 記載のペプチド系化合物の製造方法。

【請求項 40】 請求項 1 乃至 19 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列

プラムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

**【請求項 4 1】** 請求項 1 乃至 1 9 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法。

**【請求項 4 2】** 請求項 1 乃至 1 9 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物。

**【請求項 4 3】** 請求項 1 乃至 1 9 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードする DNA を有するベクターを、当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法。

# **【発明の詳細な説明】**

## **【0001】**

本発明を詳細に説明するに先立ち、用語を以下のように定義する。

ペプチドとは、複数のアミノ酸がペプチド結合で連なった化合物のことをいう。ここでアミノ酸(又はアミノ酸残基とも表現する)とは、アミノ酸の一般式;  $\text{NH}_2\text{-CH(R')-COOH}$  において、 $\text{R'}$  が天然に存在する置換基を有する天然アミノ酸の他、その D, L-光学異性体等を含む。

天然アミノ酸が修飾アミノ酸(又は修飾アミノ酸残基と表現する)で置換されて

において、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド、カルバミド又はチオカルバミド等を介して又は介さずに、様々な置換基が結合した非天然アミノ酸も含む。また、アミノ酸のアミノ基に低級アルキル基が置換されている非天然アミノ酸も含まれる。

ペプチド類縁体とは、ペプチドにおいて少なくとも1つのアミノ酸が非アミノ酸化合物で置換された化合物のことをいい、従って当該置換化合物のペプチド類縁体への少なくとも1つの結合はペプチド結合ではない。

また、これらペプチド及びペプチド類縁体のアミノ末端及び／又はカルボキシル末端が修飾された化合物を誘導体とし、ペプチド、ペプチド類縁体及びそれらの誘導体を総称してペプチド系化合物とした。

配列番号2記載のアミノ酸配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列とは、以下に掲げる配列をいう。

Gly Ser Ser Phe、

Gly Ser Ser Phe Leu、

Gly Ser Ser Phe Leu Ser、

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro、

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu、

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His、又は、

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln。

【0002】

#### 【発明の属する技術分野】

本発明は、ペプチド中のアミノ酸が修飾されていることを特徴とした、細胞内カルシウム濃度を上昇させる作用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有する新規ペプチドに関する。本願発明はまた、当該新規ペプチドの取得方法及び製造方法、該ペプチド及び該ペプチドの前駆体をコードする遺伝子、及び当該遺伝子を用いた該ペプチド及び該ペプチドの前駆体の製造方法に関する。さらに本願発明は、本願発明により開示された新規修飾ペプチドの構造類似体で、成長ホルモ

用あるいは成長ホルモンの分泌誘導活性を有するペプチド類縁体及びその製造方法に関する。本願発明はまた、該ペプチド若しくは該ペプチド類縁体を有効成分とする医薬用組成物、動物用成長促進剤、又は該ペプチドの抗体若しくはその利用方法に関する。

### 【0003】

#### 【従来の技術】

成長ホルモン（growth hormone、以下単にGHと略称する）は、下垂体前葉で合成されるタンパク質ホルモンで、骨の成長及び脂肪細胞や軟骨細胞の分化を間接的に促進し、その分泌は、成長ホルモン放出ホルモン（GHRH: growth hormone-releasing hormone）で促進され、ソマトスタチン（somatostatin）で阻害される [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p.462]。GHは単に成長を促すだけではなく、各種組織でのタンパク質合成の促進、貯蔵脂肪の移動の刺激及び筋肉中のグリコーゲン含量の上昇などの作用もあり、GH分泌の低下は小人症を、過剰分泌は巨人症又は末端肥大症を惹起する [八杉龍一ら編, 岩波生物学辞典第4版 (岩波書店, 東京, 1997), 757頁]。

### 【0004】

ヒトGHが遺伝子組換え技術によって生産されるようになって以来、GHは上記小人症の治療 [J. O. Jorgensen, Endocr. Rev. 12, 189 (1991)] だけでなく、他の疾患の治療にも用いられ、様々な効果が見いだされた [J. O. Jorgensen, et al., Horm. Res. 42, 235 (1994)]。例えば、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化 [K. Brixen, et al., Miner. Res. 5, 609 (1990)]、GH欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 688 (1991)]、GH欠乏症成人での運動能力の向上 [R. C. Cuneo, et al., J. Appl. Physiol. 70, 695 (1991)]、小児の重度火傷治癒 [D. N. Herndon, et al., Ann. Surg. 212, 424 (1990)]、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用 [R. Homburg, et al., Clin. Endocrinol. (Oxf). 32, 781 (1990)]、ブレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防 [F. F. Horber and M. W. Haymond, J. C

、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果 [D. Rudman, et al. N. Engl. J. Med. 323, 1 (1990)] などがある。

#### 【0005】

小児の成長促進、及び成人のGH欠乏に伴う代謝や機能の欠損の正常化に、組換えGHの投与は効果的ではあるが、用量限定的な副作用があること、経口投与ができないこと及びコスト面で問題がある [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormon Secretagogues in Clinical Practice, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p.107-p.108]。多くの成人患者は、過剰なナトリウムと体液の貯留によると思われる関節痛や手根管症候群のような副作用のため、GH投与を継続することができない [E. Corpas, et al., Endocr. Rev. 14, 20 (1993)]。これらの副作用は、GH投与によるホルモン分泌の非生理的なパターンと関係しており、GHの投与では正常なGH分泌の拍動性 (pulsatility) をまねることができない [B. A. Lefker, et al., in Growth Hormon Secretagogues in Clinical Practice, B. B. Bercu and R. F. Walker, Eds. (Marcel Dekker, Inc., New York, 1998), p.107-p.108]。

#### 【0006】

生体内でのGH分泌の拍動性は、基本的には視床下部由来の2つの制御因子の相互作用によって確立される、すなわちGHRHとソマトスタチンが下垂体に作用してGH分泌を制御している [G. S. Tannenbaum and N. Ling, Endocrinology 115, 1952 (1984), R. G. Clark and I. C. Robinson, Endocrinology 122, 2675 (1988)]。正常なGH分泌のパターンは昼夜で異なり、夜間に、より多くのGHがより頻繁に放出される。GHの放出パルスの振幅は、種々のステロイド・ホルモン、神経伝達物質、GHとインシュリン様成長因子によるフィードバック、栄養状態、睡眠及び運動によって、さらに調節される [J. S. Strobe1 and M. J. Thomas, Pharmacol. Rev. 46, 1 (1994)]。

#### 【0007】

上に記載したGH投与に伴う副作用を克服するために、GH分泌誘導活性を有する



RP-6 (Growth Hormone-Releasing hexapeptide) などのペプチドが合成され、GHの欠損乃至は低下に起因する治療薬として開発された [C. Y. Bowers, et al., Endocrinology 114, 1537-1545 (1984)]。しかし、これらのペプチド化合物は静脈注射でしか効果を発揮できないので、経口投与可能な低分子量の非ペプチド系化合物が開発され [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)]、第二相臨床試験の段階にまで進んでいるものもある [A. A. Patchett, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 7001-7005 (1995)]。

### 【0008】

細胞における、レセプターのシグナル受容から機能発現に至るまでの一連の情報伝達をシグナル伝達 (signal transduction) というが、Gタンパク質と共役したシグナル伝達系は以下のような機構で進行する [八杉龍一ら編, 岩波生物学辞典第4版 (岩波書店, 東京, 1997), 555-556頁]。このGタンパク質共役系は細胞膜7回貫通型レセプターをもち、cAMPをセカンドメッセンジャーとして産生するcAMP系とイノシトール-1,4,5-三リン酸 (IP3) やジアシルグリセロール (DG) イノシトールリン脂質情報伝達系に分けられる。cAMPはcAMP依存性のキナーゼ (Aキナーゼ) を活性化し、機能タンパク質のセリンやスレオニン残基のリン酸化を起こし、活性を修飾する。一方、IP3は小胞体上のIP3受容体と結合し、カルシウムイオンの遊離を促し、DGはCキナーゼを活性化してホルモンなどの作用発現を促す。

### 【0009】

IP3やDGをセカンドメッセンジャーとするシグナル伝達系で、細胞内カルシウムイオン濃度が上昇する機構は以下の如くである [J. Kendrew, et al., Eds., The Encyclopedia of Molecular Biology (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 136-137]。レセプターヘリガンドが結合すると、Gタンパク質を介してホスホリパーゼCが活性化されて、PIP2からIP3が生成する。IP3は細胞内顆粒であるERなどの小胞体に貯蔵されているカルシウムイオンを細胞質に放出させ、細胞質中のカルシウムイオン濃度が上昇する。IP3もしくはカルシウムイオンがさ

らに細胞質に存在すると、カルシウムは再び小胞体に取り込まれ、細胞質中のカルシウムイオン濃度は低下する。すなわち、レセプターへのリガンドの結合は、細胞質中のカルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらす。

【0010】

GHSはGHRHによるGHの分泌及び細胞内cAMPレベルの上昇に協奏的に作用すること [K. Cheng, et al., *Endocrinology* 124, 2791-2798 (1989)]、及びGHRHのレセプターへの結合はcAMPをセカンドメッセンジャーとして産生するのに対して、GHSは細胞内カルシウムイオン濃度の上昇をもたらすことから、GHSの作用機作はGHRHのそれとは異なることが示唆され [J. Herrington and B. Hille, *Endocrinology* 135, 1100-1108 (1994).]、GHSはGHRHが結合するGHRHレセプターとは異なるレセプターに結合することが想定された。実際にGHSが結合するレセプター遺伝子がクローニングされ、ノザン解析の結果からGHSレセプター (GHS-R) は視床下部及び脳下垂体で発現していること、及びブタとヒト由来のGHS-Rのアミノ酸配列が90%以上の同一性を示すことがわかった [A. D. Howard, et al., *Science* 273, 974-977 (1996)]。しかし、GHS-Rに結合する内在性のリガンドは単離されておらず、このGHS-Rはリガンドが不明なオーファン・レセプターであった。

【0011】

タンパク質のアミノ末端又はタンパク質を構成するアミノ酸残基の側鎖に、ミリスチン酸、ゲラニル酸、パルミトイル酸、又はファルネシル酸などの脂肪酸が結合することがあるが、これらの脂肪酸の役割はこれらの脂肪酸修飾タンパク質を細胞膜にアンカーリング (anchoring) することにある [J. Kendrew, et al., Eds., *The Encyclopedia of Molecular Biology* (Blackwell Science Ltd., London, 1994), p. 616]。これらの脂肪酸修飾タンパク質において、脂肪酸はシステイン残基にS-アシル結合で結合しており、本願発明によって開示された内在性のGHSのようにセリン残基にO-アシル結合で脂肪酸が結合したアミノ酸、この脂肪酸修飾アミノ酸を含むタンパク質及びペプチドは全く知られていなかった。また、脂肪酸で修飾されたアミノ酸を含むペプチドが、いかなるレセプターのリガンドとして機能することも知られていなかった。

【発明が解決しようとする課題】

GHSレセプターに結合して細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又はGH分泌を誘導する活性を有する内在性のリガンド、すなわち内在性GHSの発見及び利用方法が所望されていた。さらに、当該内在性GHSの構造類似体で、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させるか、又はGH分泌誘導活性を有する化合物が望まれていた。また、当該内在性GHS又はその構造類似化合物を含有し、GHの拍動的な分泌を誘導することによってGH投与による副作用のない医薬組成物あるいは動物の成長を促進するための組成物、及び当該組成物を用いた治療方法が所望されていた。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本願発明者らは、GHSレセプター（GHS-R）へのリガンドの結合がイノシトールリン脂質をセカンドメッセンジャーとして細胞内カルシウムイオン濃度の一過性の上昇をもたらすことに着目し、GHS-Rを発現させたCHO細胞（CHO-GHSR62）において細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性（Ca上昇活性）を指標に、各種臓器又は組織の抽出物をスクリーニングした。その結果、ラット胃の抽出物に強いCa上昇活性があることを見だし、当該抽出物より各種クロマトグラフィーを用いてCa上昇活性を有する物質を精製して、該物質が脂肪酸で修飾された分子量約3,000の新規ペプチドであることを見いだした。さらに当該新規ペプチドが、下垂体前葉細胞からのGHの特異的な分泌を促進することを確認して、該新規ペプチドがGHS-Rの内在性のリガンド、すなわち内在性GH分泌誘導物質（内在性GHS）であることを見出した。すなわち、本願発明の第一は、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性又はGH分泌誘導活性を有し、構成アミノ酸残基が脂肪酸で修飾されていることを特徴とする内在性のGH分泌誘導ペプチド、及び該ペプチドの取得方法である。

【0014】

本願発明者らは、該内在性GH分泌誘導ペプチドの構造を詳細に解析し、該ペプチドが配列番号2に記載のアミノ酸配列からなるペプチドであり、アミノ末端が

またラットと同様、強いCa上昇活性が存在するヒト胃抽出物中からも、ラット由来のGH分泌誘導ペプチドと同様の方法で精製及び構造解析を行った結果、ヒト由来の内在性GH分泌誘導ペプチドも配列番号3に記載のアミノ酸配列からなり、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基が脂肪酸でアシル化されていることがわかった。ラット及びヒト由来の内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列を比較すると全体で89%の高い同一性を示した。

より詳しくは、ラットとヒトではアミノ末端から10番目までのアミノ酸配列及び13~28番目のアミノ酸配列は同一であるが、11番目と12番目のアミノ酸がラットでリジン、アラニンであり、ヒトでこれらがそれぞれアルギニン、バリンに置換されている点で相違している。ラット由来の内在性GH分泌誘導ペプチドを各種プロテアーゼで切断し、精製したペプチド断片のCa上昇活性を測定した結果、アミノ末端から7番目までのアミノ酸配列からなるペプチドがCa上昇活性を有する最小のペプチドであった。

#### 【0015】

さらに、化学合成したペプチドのCa上昇活性の測定などから、Ca上昇活性発現に必須のコア配列は配列番号8に記載の4アミノ酸からなる配列であることがわかった。また、ラット以外のヒト、ブタ、ウシから分離した内在性GH分泌誘導ペプチド(28アミノ酸)およびこれらのペプチドから1つグルタミンが欠失した内在性GH分泌誘導ペプチド(27アミノ酸)のいずれにおいても、配列番号9に記載の10アミノ酸からなる配列が保存されていた。

すなわち、本願発明の第2は、配列番号8に記載のアミノ酸配列、望ましくは配列番号1に記載のアミノ酸配列、より望ましくは配列番号9に記載のアミノ酸配列をCa上昇活性発現に必須のコア配列として含む脂肪酸修飾ペプチドである。

なお、ニワトリ、ウナギからも内在性GH分泌誘導ペプチドが単離され、配列番号8に記載の4アミノ酸からなるコア配列を有していることがわかった。

一方、カエルからもラットの内在性GH分泌誘導ペプチドと非常に類似性の高い内在性GH分泌誘導ペプチドが単離された。

#### 【0016】

本願発明によって開示されたGH分泌誘導活性をもつ内在性脂肪酸修飾ペプチド  
Printed: 02-08-2002 PRIODOC-X 00946453-JP 0004907  
又は上記コア配列からなる脂肪酸修飾ペプチドは、Ca上昇活性を有する化合物の  
設計指針も提供する。

すなわち、本発明の第三は、当該脂肪酸修飾ペプチドの構造類似化合物を合成し、該構造類似化合物のCa上昇活性を確認することにより、Ca上昇活性を有する新規化合物を取得することである。従って、細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチド又はペプチド類縁体において、構成アミノ酸が修飾アミノ酸又は非アミノ酸化合物で置換された化合物も本願発明に属することはいうまでもない。

#### 【0017】

内在性GH分泌誘導ペプチドをコードするcDNAを常法により取得した。配列番号4及び5に記載したアミノ酸配列に示された如く、ラット及びヒトのcDNAはいずれも117アミノ酸からなり、アミノ末端から24番目ないし51番目まで28アミノ酸の配列がラット及びヒトの内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列と各々一致した。すなわち、内在性GH分泌誘導ペプチドは117アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の23アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の56アミノ酸が切断除去されてGH分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドが生成することが明らかになった。また、ブタからも28アミノ酸からなる内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体をコードするcDNAが見いだされた。

従って、本願発明の第4は、内在性GH分泌誘導ペプチドの前駆体をコードするcDNA及び当該cDNAを用いたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はペプチド類縁体の原料となるペプチドの製造方法である。

#### 【0018】

ラット胃抽出物から28アミノ酸で構成される内在性GH分泌誘導ペプチド（グレリン）を精製する際に、マイナー画分として回収されるペプチドを解析したところ、グレリンの13番目若しくは14番目のグルタミンが1つ欠失した27アミノ酸からなるペプチド（グレリン-27）を見いだした。グレリン-27は28アミノ酸からなるグレリンと全く同様のCa上昇活性およびGH分泌誘導活性を有しており、内

【0019】

グレリンの13番目および14番目のグルタミンをコードしている塩基配列は、gca gcaでありmRNAのスプライシング(splicing)が起こるエクソンの末端の配列であり、異ったスプライシングが起こることにより、2つのグルタミンのコードンのうち1つが脱落したcDNAが生成する可能性が示唆された。実際にラット及びヒトのcDNAライブラリーを探索したところ、27アミノ酸からなるグレリン-27の前駆体ペプチドをコードするcDNAが見つかった。

すなわち、ラットおよびヒトのグレリン-27ペプチドは、配列番号12又は13に記載した116アミノ酸からなる前駆体ペプチドとして合成され、アミノ末端側の23アミノ酸からなるシグナルペプチドが切断を受け、さらにカルボキシル末端側の56アミノ酸が切断除去されて27アミノ酸からなるGH分泌誘導活性をもつ脂肪酸修飾ペプチドとして生成することが明らかになった。

また、ブタおよびウシからもグレリン-27ペプチドの前駆体をコードするcDNAが見いだされ、これらの動物においてもグレリン-27およびその前駆体の存在が確認された。

すなわち、配列番号10、11、17および22記載のアミノ酸配列からなるグレリン-27ペプチド、及び配列番号12、13、19および23記載のアミノ酸配列を有するグレリン-27前駆体ペプチド、並びに配列番号14、15、21、および24に記載の塩基配列を有する該前駆体ペプチドをコードするcDNAも本発明に属することはいうまでもない。

【0020】

本願発明で開示されたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチド又はCa上昇活性を有するペプチド類縁体又はペプチド系化合物は、GHの欠損又は低下に起因する疾患を治療するための医薬組成物も提供する。該医薬組成物はGHの投与が有効である全ての疾患に用いることができ、GHの投与によって生じる様々な副作用を克服することができる。また、該医薬組成物は動物の成長促進剤などの動物用薬剤としても用いることができる。

【0021】

本願発明で開示されたCa上昇活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原として調製された抗体、当該抗体を用いた内臓性GH分泌誘導ペプチドの測定方法、及び該抗体を具備した測定キットも本願発明に属する。

### 【0022】

すなわち本願発明は、アシル化セリンという新規修飾アミノ酸を有する新規ペプチドホルモンを提供し、又当該ペプチドの構造を基本骨格とするCa上昇活性有する化合物の新規設計指針をも提供する。

さらに、本願発明によって開示された脂肪酸修飾ペプチド、GH放出ホルモン及びソマトスタチンによるGH分泌誘導機構の解明は、単にGH分泌誘導機構に限らず他のホルモン分泌制御機構にも敷衍することが示唆される。本願発明は、脂肪酸修飾ペプチドの循環器系および代謝系の制御因子としての多様な機能を開示するものであり、本願発明の効果は新しい生体制御機構の解明にも及ぶものである。

### 【0023】

具体的には本願発明は

(1) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有するペプチドの少なくともひとつのアミノ酸が、修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されていることを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(2) (a) 配列番号2記載のアミノ酸配列又は(b) 当該配列において少なくともアミノ末端から4番目乃至10番目までのアミノ酸配列を有し、かつ該アミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記(1)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(3) 配列番号3、4、5、8、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22、23、25及び26記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記(2)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(4) 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドの(a) 構成アミノ酸が修飾されているか又は

されていて、かつ (b) 少なくともひとつのアミノ酸が非アミノ酸化合物により直接されているか又はされていないペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(5) 配列番号 27 記載のアミノ酸配列を有する前記 (1) 又は (4) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(6) (a) 配列番号 2 記載のアミノ酸配列又は (b) 当該配列において少なくともアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列を有し、かつアミノ末端から 4 番目乃至 10 番目までのアミノ酸配列以外の部分において、少なくともひとつのアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列を含む前記 (4) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(7) 配列番号 3、4、5、9、10、11、12、13、16、17、18、19、22、23、25 及び 26 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列を有する前記 (6) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(8) アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が、下記の式で表される前記 (1) 又は (4) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

A-B-C-D-

A; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

B; アミノ酸、非アミノ酸化合物、又はなし、

(ただし、A+B の分子鎖長がジペプチド相当長ある。)

C 又は D; 同一であっても異なってもよく、(a) 修飾されたアミノ酸、又は (b) 疎水性側鎖を有するアミノ酸、を表す。

(9) 配列番号 2、3、8、9、10、11、16、17、22、25 及び 26 記載のアミノ酸配列からなる群から選択されるひとつのアミノ酸配列において、アミノ末端の 1 番目から 4 番目に至るまでのアミノ酸配列に相当する部分が前記 (8) に記載のペプチド系化合物であるペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、



(10) 修飾アミノ酸が、アミノ酸の側鎖に、(a) 炭素数1以上のアルキル基を介して又は介さず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、ジスルフィド、アミド、カルバミド又はチオカルバミド結合を介して炭素数が1若しくは複数の飽和若しくは不飽和アルキル鎖、又は(b) 炭素数1以上の飽和若しくは不飽和アルキル鎖を導入したアミノ酸である前記(1)乃至(9)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(11) アミノ酸の側鎖の官能基がエステル結合を形成することにより修飾された修飾アミノ酸を有する前記(1)乃至(10)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(12) アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸がエステル結合したアミノ酸を有する前記(11)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(13) 脂肪酸が炭素数2乃至35である前記(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(14) 脂肪酸が炭素数2、4、6、8、10、12、14、16および18の脂肪酸からなる群から選ばれた脂肪酸である前記(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(15) 脂肪酸がオクタン酸(octanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(16) 脂肪酸がデカン酸(decanoic acid)、又はそのモノエン脂肪酸若しくはそのポリエン脂肪酸である前記(12)記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩、

(17) アミノ末端のアミノ基が、炭素数1以上の飽和あるいは不飽和アルキル又はアシル基の導入により修飾され及び/又はカルボキシル末端のカルボキシル基のOHがOZ又はNR<sub>2</sub>R<sub>3</sub>(Zは薬学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基を示し、R<sub>2</sub>及びR<sub>3</sub>はH及び低級の分枝鎖又は非分枝鎖アルキル基からなる群から選択される互いに同一又は異なる基を示す。)であることを特徴とする前記(1)乃至(16)項記載のペプチド系化合物、

(19) 前記 (1) 乃至 (16)、又は (18) 記載のペプチド系化合物のカルボキシル末端アミド誘導体に、更に塩基性基を導入したことを特徴とするペプチド系化合物、

(20) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物、

(21) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための医薬組成物、

(22) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有することからなる当該疾患を治療するための医薬組成物、

(23) ヒト以外の動物に適用するための前記 (20) 乃至 (22) 記載の医薬組成物、

(24) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を有効成分とする医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(25) 成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患に係る治療剤と、前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩を含有する医薬組成物を投与することからなる成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、

(26) ヒト以外の動物に適用するための前記 (24) 又は (25) 記載の治療方法、

(27) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAであって、当該DNAがコードするアミノ酸配列中に少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドをコードする塩基配列を有する当該DNA、

(28) 塩基配列が、配列番号 6、7、14、15、20、21 および 24 記載

(29) 塩基配列が、配列番号 6、7、14、15、20、21 および 24 記載の塩基配列からなる群から選ばれた一つの塩基配列中、アミノ酸をコードしている塩基配列である前記 (27) 記載の DNA、

(30) 前記 (27) 乃至 (29) 記載の DNA を有するベクター、

(31) 前記 (30) 記載のベクターを含有する細胞、

(32) 前記 (27) 乃至 (29) 記載の DNA を有するベクターを有し、且つ当該 DNA にコードされるアミノ酸配列を有するペプチド系化合物が、当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されたペプチド系化合物として産生することができる細胞、

(33) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物に対する抗体、

(34) 前記 (33) 記載の抗体を用いて前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする該ペプチド系化合物のアッセイ方法、

(35) 前記 (33) 記載の抗体を用いて前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物を検出することを特徴とする該ペプチド系化合物の検出用キット、

(36) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記 (27) 乃至 (29) 記載の DNA を含有するベクターにより、当該ペプチド中の少なくともひとつのアミノ酸の側鎖を修飾することができる宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的のペプチド系化合物を採取することからなる当該方法、

(37) 前記 (1) 乃至 (19) 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、前記 (27) 乃至 (29) 記載の DNA を含有するベクターにより宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換細胞を培養して培養物から目的物質を採取後、任意のアミノ酸を化学的に修飾することを特徴とする当該方法、

(38) 前記 (12) 乃至 (16) 記載のペプチド系化合物を遺伝子組換え技術を用いて製造する方法において、アミノ酸の側鎖の水酸基又はメルカプト基に、脂肪酸をエステル結合させる活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記 (

12)乃至(16)記載のペプチド系化合物の製造方法、

Printed:02-03-2002

PRIDOC-X

00946453-JP000496

(39)配列番号8記載のアミノ酸配列中のセリンの側鎖の水酸基に脂肪酸をエステル結合させるセリンアシル化活性を有する細胞を用いることを特徴とする前記(12)乃至(16)記載のペプチド系化合物の製造方法、

(40)前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより、成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、

(41)前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因する疾患の治療方法、

(42)前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを含有するベクターを生体内細胞に組み込み、細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有する、少なくともひとつの修飾されたアミノ酸を有するペプチドを発現することにより成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患を治療するための遺伝子治療用医薬組成物、及び

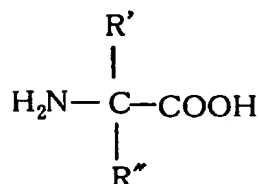
(43)前記(1)乃至(19)記載のペプチド系化合物のアミノ酸配列をコードするDNAを有するベクターを、当該DNAにコードされるアミノ酸配列を有するペプチドが当該アミノ酸配列中の少なくともひとつのアミノ酸が修飾されうる認識配列を有するペプチドとして産生することができる生体内の細胞に組み込むことにより、成長ホルモンの分泌を誘導する活性を有するペプチドを発現させることを特徴とする成長ホルモンの欠損又は減少に起因しない疾患の治療方法、に関する。

#### 【0024】

本発明において、アミノ酸とはL-アミノ酸、D-アミノ酸、 $\alpha$ -アミノ酸、 $\beta$

# 【0025】

本発明において修飾アミノ酸とは、上記アミノ酸の任意の基が化学修飾されているアミノ酸を意味する。特に、α-アミノ酸におけるα炭素が化学修飾されている修飾アミノ酸が好ましい。すなわち、修飾アミノ酸は、α-アミノ酸を式【化1】



で表したとき、R'、R''はH又は任意の置換基でよくて、要するに天然アミノ酸を化学修飾したものならどのようなものでもよい。なお、R'、R''とのいずれか一方はHでもよい。

R'、R''で示される置換基としては、天然のアミノ酸に存在する置換基を、天然のアミノ酸又はそれに対応するD-アミノ酸に存在しない置換分で置き換えたアミノ酸を修飾アミノ酸と称す。

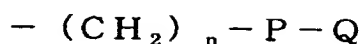
# 【0026】

そのような置換分として、例えば天然に存在するアミノ酸が側鎖に-OH、-SH、-NH-又は-NH<sub>2</sub>を含む場合、これらをアシル化して形成される基が好適な例として挙げられる。

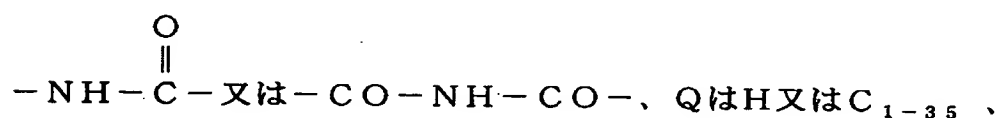
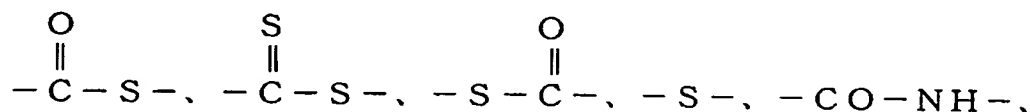
そのためのアシル基としては 本発明におけるアシル化によって水酸基に導入されるアシル基は例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される基である。有機カルボン酸としてはより具体的には、脂肪酸が挙げられ、その炭素数は好ましくは2～35（より好ましくは6～18、最も好ましくは8～16）である。そのような脂肪酸としては、具体的には、オクタン酸（好ましくは、カプリル酸）、デカン酸（好ましくは、カプリン酸）、ドデカン酸（好ましくは、ラウリル酸）、それらのモノエン又はポリエン脂肪酸等が挙げられる。

又、さらに修飾アミノ酸は上記のR'又はR''及びR'''で示される基を例えは式

【化2】



(式中、nは0～10の整数、Pは $-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{O}-$ 、 $-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-$ 、 $-\text{O}-$ 、



好ましくは $\text{C}_{1-20}$ のアルキル)

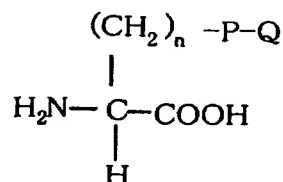
で置き換えたアミノ酸であってもよい。さらにPは $-\text{CO}-$ でもよい。

さらに、Pは $-\text{S}-\text{S}-$ 、又は $-\text{NH}-\text{CS}-$ であってもよい。又上記全ての $-\text{NH}-$ において、Hが $\text{C}_{1-35}$ の飽和又は不飽和アルキル基、 $\text{C}_{6-20}$ のアリール基で、 $\text{C}_{7-13}$ のアラルキル基で置換されていてもよい。

【0028】

$\alpha$ -アミノ酸を上記式で表わした場合に、R'又はR''を上記の $-(\text{CH}_2)_n-\text{P}-\text{Q}$ で置き換えた修飾アミノ酸は好ましい実施の態様である。特にアミノ酸がセリンの $\alpha$ 炭素に上記の式の $-(\text{CH}_2)_n-\text{P}-\text{Q}$ で示される置換基が存在する式

【化3】



で示される修飾セリンを構成単位とするペプチドが好ましい。

【0029】

炭素数1以上のアルキル基を介して又は介さずエステル、エーテル、チオエス

### 【0030】

例えば、アミノ酸がセリン、トレオニン、チロシン又はオキシプロリンである場合は、そのアミノ酸は側鎖に水酸基を有する。アミノ酸がシステインである場合は、そのアミノ酸は側鎖にメルカプト基を有する。アミノ酸がリジン、アルギニン、ヒスチジン、トリプトファン、プロリン又はオキシプロリンである場合は、側鎖にアミノ基又はイミノ基を有する。

### 【0031】

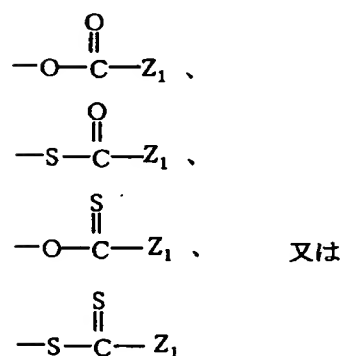
これらの水酸基、メルカプト基、アミノ基、イミノ基は化学修飾されていてもよい。すなわち水酸基又はメルカプト基はエーテル化、エステル化、チオエーテル化又はチオエステル化されていてもよい。イミノ基はイミノエーテル化、イミノチオエーテル化、アルキル化されていてもよい。アミノ基はアミド化、チオアミド化又はカルバミド化されていてもよい。

また、メルカプト基はジスルフィド化されていてもよく、イミノ基はアミド化、又はチオアミド化されていてもよく、アミノ基はアルキル化又はチオカルバミド化されていてもよい。

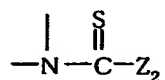
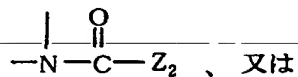
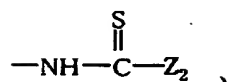
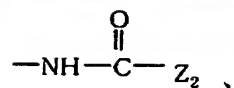
### 【0032】

そのように化学修飾された水酸基又はメルカプト基は例えば式

【化4】

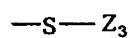
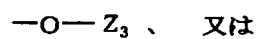


で表わすことができ、アミド化又はチオアミド化されたアミノ基又はイミノ基は



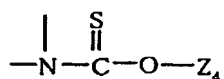
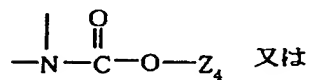
で表わすことができ、エーテル化された水酸基又はメルカプト基は式、

【化6】



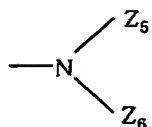
で表わすことができ、イミノエーテル化又はイミノチオエーテル化されたイミノ基としては式

【化7】



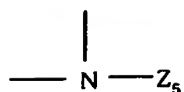
で表わすことができ、アルキル化されたアミノ基として式

【化8】



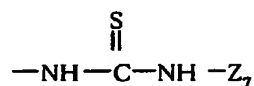
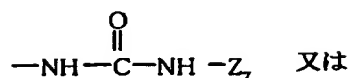
で表わすことができ、アルキル化されたイミノ基として式





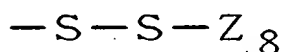
で表わすことができ、カルバミド化又はチオカルバミド化されたイミノ基として式

【化 1 0】



で表わすことができ、ジスルフィド化されたメルカプト基は、式

【化 1 1】



表わすことができる。

上記式中、 $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 、 $Z_6$ 、 $Z_7$  及び  $Z_8$  は本発明の精神に反しない限り、どのような化学修飾のための置換基であってもよいが、医薬品分野で常用されるあるいはペプチドのための化学修飾のための置換基が特許文献上又は学術文献上もよく知られているので、本発明においてもそのような自体公知の修飾のための置換基を採用することができ、かつ化学修飾はそのような従来公知の方法に従って行われてよい。

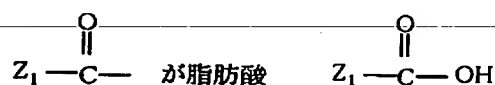
【0 0 3 3】

上記式において、 $Z_1$  は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基であってよく、かかるアルキル基は飽和されているものであってもよく、不飽和アルキルであってよい。炭素数は通常は  $C_{1-50}$ 、好ましくは  $C_{6-20}$  である。 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 、 $Z_6$ 、 $Z_7$  又は  $Z_8$  は水素原子又は直鎖状、分枝状もしくは環状のアルキル基であってよく、かかるアルキル基は飽和又は不飽和であってよい。炭素数は通常  $C_{1-10}$ 、好ましくは  $C_{1-6}$  である。かかる  $Z_1$ 、 $Z_2$ 、 $Z_3$ 、 $Z_4$ 、 $Z_5$ 、 $Z_6$ 、 $Z_7$  又は  $Z_8$  で表されるアルキル基は、例えば、水酸基、アミノ基、ハ

【0034】

上記において、

【化12】



の残基である場合は、脂肪酸が結合したアミノ酸の一例である。その場合の脂肪酸としては、例えばカプリル酸、カプリン酸、ララリン酸、酪酸、カブロン酸、ウンデシル酸、バルミチン酸、デカン酸、ノナデカン酸、ベヘン酸、モンタン酸、若しくはラクセン酸などの飽和脂肪酸、例えばアクリル酸、オレイン酸、リノール酸、リノレン酸、若しくはアアテアロール酸などの不飽和脂肪酸が挙げられる。不飽和脂肪酸はモノエンであってもよいし、ポリエンであってもよい。

【0035】

又さらに、修飾アミノ酸は $\alpha$ -アミノ酸の炭素に $\alpha$ 炭素に結合する、ペプチド結合を構成するカルボキシル基とアミノ基以外の基を水素原子又は飽和又は不飽和アルキル基で置換することにより形成される $\alpha$ -アミノ酸であってもよい。

【0036】

又さらに、本発明において修飾アミノ酸は、アミノ酸のアミノ基に炭素数1乃至6の飽和又は不飽和アルキル基で置換することにより形成されるアミノ酸であってもよい。

【0037】

本発明における非天然アミノ酸としては、アミノ基とカルボキシル基を分子の両端に有するものであって、例えば、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{COOH}$ 、 $\text{NH}_2-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(\text{CH}_2)_3-\text{COOH}$ 、又は $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$ 等が挙げられる。これらはいずれも、分子鎖長がジペプチド相当長であるが、分子鎖長がペプチド相当長のものも当然含まれる。

また、本発明における非アミノ酸化合物としては、例えば、 $\text{NH}_2-\text{CH}(\text{CH}_2\text{OH})-\text{CH}_3$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{COOH}$ 、 $\text{CH}_3-\text{CH}(\text{R})-\text{CH}_3$ （いずれも、分子鎖長がペプチド相当

長) 又は  $\text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 \text{CH}(\text{CH}_2\text{OH}) - \text{CH} - \text{NH}_2 - (\text{CH}_2)_3 \text{CH}(\text{R}) - \text{CH}$  (いずれも、  
分子鎖長がペプチド相当長) 等がつけられる。

ここで、Rは、天然アミノ酸の側鎖又は修飾アミノ酸の $\alpha$ 炭素の置換基を表す。

### 【0038】

#### 【発明の実施の態様】

GHSレセプター (GHS-R) の内在性リガンドとなるペプチドについては、GHS-Rを発現している細胞に各種臓器又は組織の抽出物を添加し、細胞内カルシウムイオン濃度を測定することにより、当該内在性リガンドの臓器・組織間での分布を知ることができる。

GHS-Rを発現している細胞としては、恒常的にGHS-Rを発現していることが知られている視床下部及び脳下垂体、及びそれらの組織由来の細胞株があるが、GHS-R遺伝子を適当な細胞、例えばCHO細胞に導入・発現させた形質転換細胞が望ましい。

本願発明の内在性GHSペプチドにおいては、該ペプチドが発現している視床下部及び脳下垂体ではなく、消化器系の臓器である胃の抽出物に強いCa上昇活性が認められた。従って、目的のオーファン・レセプターの内在性リガンドを見いだすためには、該レセプターが発現している組織・臓器ばかりではなく、他の組織・臓器も広く探索することが必要である。

### 【0039】

細胞内カルシウムイオン濃度の測定法は公知の方法が利用できるが、望ましくは、カルシウムイオン濃度変化によるFluo-4 AM (Molecular Probe社) の蛍光強度の変化を利用したFLIPR (Fluorometric Imaging Plate Reader, Molecular Devices社) がよい。

### 【0040】

Ca上昇活性が確認された組織・臓器の抽出物から、目的の内在性GHSペプチドを生成するためには、公知の精製方法を用いることができる。

ペプチドの精製法としては、各種分画法による分画後、ゲル濾過、イオン交換及び逆相クロマトグラフィーを、単独又は組み合わせて用いるが有効であるが、

また、組織・臓器よりペプチドを単離・精製する際には、組織・臓器に存在するプロテアーゼの作用による目的ペプチドの分解を防止するために、組織・臓器を沸騰水中で熱処理することによりプロテアーゼを失活させることが望ましい。熱処理し組織・臓器を氷冷除去すること、目的ペプチドの抽出・精製に効果がある。

#### 【0041】

精製されたCa上昇活性を有するペプチドが、in vitro 及びin vivoでGH分泌誘導活性を確認するためには、公知の方法を利用することができる。

例えばin vitroでは、GHを分泌してGHS-Rの発現も確認されている脳下垂体細胞に添加して、細胞培養液中に分泌されるGHを、抗GH抗体を用いたラジオイムノアッセイによって測定することができる。また上記ラジオイムノアッセイ法において、抗GH抗体の代わりに他のホルモンに対する抗体を用いれば、該ホルモンの分泌量も測定できる。

in vivoでのGH分泌誘導活性を確認するためには、Ca上昇活性を有するペプチドを動物の末梢静脈に注射した後の血清中のGH濃度を測定すればよい。

#### 【0042】

精製されたペプチドの構造解析には、公知の方法が使用可能である。

ペプチドのアミノ酸配列を決定するためには、エドマン分解法によりカルボキシル末端より逐次アミノ酸残基を遊離して、該遊離アミノ酸を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によってアミノ酸を同定する方法、及び該方法を自動化したアミノ酸シーケンサーによる方法がある。

また、GC-MASSによってイオン化したフラグメントの分子量を測定することにより、アミノ酸配列を決定する方法もある。

#### 【0043】

本願発明の1つである修飾アミノ酸を含有するペプチドの場合は、上記アミノ酸配列を決定する際に修飾アミノ酸が「未知アミノ酸」と同定される。

この場合、当該修飾ペプチドをアミノ酸単位に分解後、修飾アミノ酸を分離・

#### 【0044】

構造決定されたペプチド中での、Ca上昇活性に必要な部分のアミノ酸配列（コア配列）は、該ペプチドをプロテアーゼで切断して生成するペプチド断片のCa上昇活性を測定することによって明らかにされる。

用いられるプロテアーゼは、切断するペプチドのアミノ酸配列に特異性の高いプロテアーゼを用いてよいが、特異性が低くても部分分解の条件で反応させることにより該ペプチドから様々なペプチド断片が調製できる。

このようにして調製されたペプチド断片のCa上昇活性を測定することにより、Ca上昇活性に必須のコア配列を知ることができる。

#### 【0045】

内在性GH分泌誘導ペプチドは、アミノ末端から3番目のセリンが脂肪酸によりアシル化されているが、内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列の一部をもったペプチド断片および当該ペプチド断片のセリンの側鎖に脂肪酸がエステル結合した脂肪酸修飾ペプチドは化学的に合成することもできる。

該合成ペプチド断片により内在性GH分泌誘導ペプチドについて詳細に解析できる。同時に、種々の脂肪酸で修飾したペプチド断片のを比較することにより、Ca上昇活性に必要な脂肪酸の種類を決めることができる。

#### 【0046】

また、脊椎動物におけるGH分泌誘導活性を有するペプチドのアミノ酸配列を比較することにより、脊椎動物で広く保存されている領域を見だし、該領域のアミノ酸配列からGH分泌誘導活性に必須のコア配列を見いだすことができる。

#### 【0047】

内在性GH分泌誘導ペプチドのアミノ酸配列から推定される塩基配列を持つDNAを化学合成し、該DNAをプローブとして該ペプチドが発現している細胞のmRNAを



シルボキシル末端が修飾されたペプチド誘導体という。

Printed: 02-03-2002

PRIDOC-X

00946453-000000

本発明において、上記のペプチド、ペプチド類縁体及びペプチド誘導体をペプチド系化合物と総称する。

また、当該ペプチド系化合物において、複数のアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸で置換されてもよい。本発明においては、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、通常アミノ末端から1～10番目、好ましくはアミノ末端から1～4又は1～5番目のアミノ酸の1又は複数のアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸で置換されているのが好適である。中でも、1～5番目のアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸で置換されているのが好適である。

又、配列番号2で表されるアミノ酸配列において、アミノ末端から1～4番目以外の部分で、好ましくは1～6番目以外の部分で、より好ましくは1～10番目以外の部分でのアミノ酸の1又は複数の欠失又は付加されていてもよい。

#### 【0050】

本発明のペプチド系化合物は好ましくは細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性及び生体内で成長ホルモンの分泌を誘導するペプチドであって、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換された化合物である。

すなわち、本発明におけるペプチド系化合物は、細胞内カルシウムイオン濃度上昇活性又は／及び生体内成長ホルモン分泌誘導作用を有し、ペプチド鎖においてアミノ酸が修飾アミノ酸又は／及び非アミノ酸化合物で置換されたペプチド系化合物である。

#### 【0051】

そのような化合物の具体例として配列番号1、2又は3が示すペプチドにおいて第3番目のアミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物、配列番号4又は5が示すペプチドにおいて第25番目アミノ酸Serの水酸基がアシル化された化合物又はその薬理学的に許容される塩が挙げられる。

#### 【0052】

本発明におけるアシル化によって水酸基に導入されるアシル基は例えば有機カルボン酸、有機スルホン酸、有機リン酸化合物から水酸基を除去して形成される

）である。そのような脂肪酸としては、具体的には、オクタン酸（好ましくは、  
 カプリル酸）、デカン酸（好ましくは、カプリン酸）、ドデカン酸（好ましくは  
 、ラウリル酸）、それらのモノエン又はポリエン脂肪酸等が挙げられる。

### 【0053】

第3番目のSerの水酸基がアシル化されている配列番号1のアミノ酸配列を含  
 む、いかなるペプチド系化合物又はその薬理学的に許容される塩も本発明におけ  
 る好ましい実施の態様である。

### 【0054】

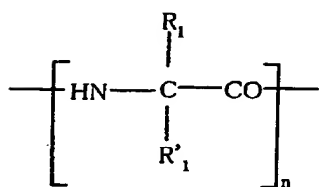
さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記一般式（1）で表される化合物  
 又はその薬理学的に許容される塩である。



（式中、Xは、アミノ末端アミノ酸のアミノ基の水素原子に相当する部分で、H又  
 は炭素数が1又は複数の飽和又は不飽和アルキル又はアシル基を表す。Yはカルボ  
 キシル末端アミノ酸の $\alpha$ -カルボキシル基の水酸基に相当する部分で、OH、OZ又  
 はNR6R7（Zは薬理学的に許容し得る陽イオン又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖  
 アルキル基を表し、R6又はR7はH又は低級の分枝鎖もしくは非分枝鎖アルキル基  
 を表し、R6とR7とは同一又は異なってもよい。）を表す。）

ここで、AA1は、式

### 【化13】



（式中、nは1又は2を表し、 $R_1$ と $R'_1$ は、同一であっても異なっておいてもよく  
 、水素又は置換基を表す。）

で表される。

ただし、nが2のときは、その二つの置換基、 $R_1$ 又は $R'_1$ は同一であってもよい

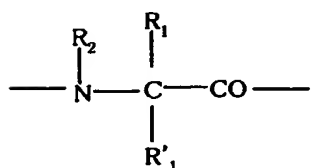


置換基の具体例としては、(1)炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は介せず、エステル、エーテル、チオエステル、チオエーテル、アミド又はカルバミドからなる群から選択される結合様式で結合する炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖、(2)H又は炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖、又は(3)天然アミノ酸の側鎖等が挙げられる。

また、炭素数1以上のアルキル鎖を介し又は介せず、ジスルフィド又はチオカルバミド結合で結合する炭素数1以上の飽和もしくは不飽和アルキル鎖であってもよい。

AA2は、式

【化14】

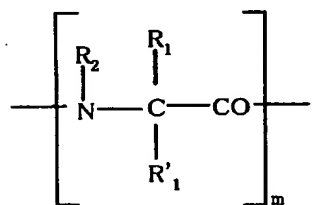


(式中、 $\text{R}_1$ と $\text{R}'_1$ は前記と同意義。 $\text{R}_2$ は、H又は炭素数1乃至6の飽和或いは不飽和アルキル基を表す。)

又は、 $\text{---CH}_2\text{---CH}(\text{R}_1)\text{---CH}_2\text{---}$ 、或いは $\text{---CH}_2\text{---CH}(\text{R}_1)\text{---CO---}$ ( $\text{R}_1$ は前記と同意義)を表す。

AA3は、式

【化15】



(式中、 $m$ は1以上の整数を表し、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}'_1$ 又は $\text{R}_2$ は、前記と同意義。) ただし、 $m$ が2以上の整数のときは、その二つの置換基、 $\text{R}_1$ 又は $\text{R}'_1$ は同一であってもよいし異なっているいてもよい。

【0055】

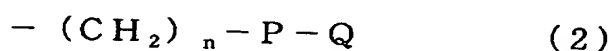
Xで示される炭素数が1以上の飽和又は不飽和アルキルとしては具体的にメチル、エチル、n-プロピル、i-プロピル、n-ブチル、s-ブチル、t-ブチル、n-ヘプチル、n-ヘキシル、n-デシル、ビニル、プロパニル又はヘキセニル等のC<sub>1-20</sub>のアルキルが好ましい。

Xで示されるアシルとしては、ホルミル、アセチル、プロピオニル、若しくはベンゾイル等のC<sub>1-10</sub>カルボン酸アシル；又はベンゼンスルホニルナフタレンスルホニル等のC<sub>7-13</sub>のスルホン酸アシルが挙げられる。

【0056】

R<sub>1</sub>又はR<sub>1</sub>'で示される基は例えば式(2)

【化16】



(式中、nは0~10の整数、Pは $-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-O-$ 、 $-O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$ 、 $-O-$ 、

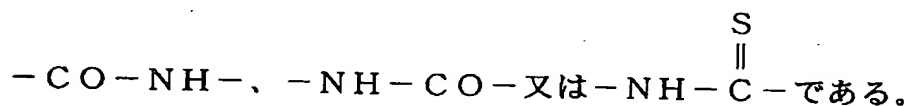
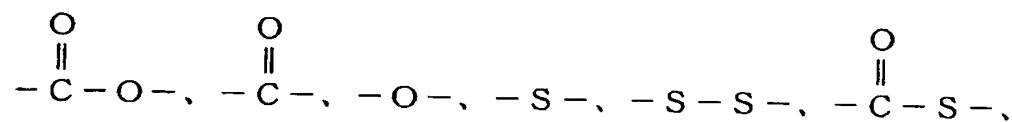
$-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-S-$ 、 $-\overset{\overset{S}{\parallel}}{C}-S-$ 、 $-S-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-$ 、 $-S-$ 、 $-CO-NH-$ 、 $-NH-CO-$ 又は $-CO-NH-CO-$ を表し、QはH又は上記したXで示されるC<sub>1-20</sub>のアルキルを表す。)

で示される基が好ましい。さらにPは $-CO-$ でもよい。

さらに、Pは $-S-S-$ 、又は $-NH-CS-$ であってもよい。また $-NH-$ において、HがC<sub>1-35</sub>の飽和又は不飽和アルキル基、C<sub>6-20</sub>のアリール基で、C<sub>7-13</sub>のアラルキル基で置換されていてもよい。

より好ましくは、Pは

【化17】





システイン、ホモシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アジピン酸、リシン、オルーチンなど、およびこれらのN-メチルアミノ酸が好ましい。

これらのアミノ酸側鎖に、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテル、あるいはチオエステル結合を介し、アシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラルキル基が結合する。また、3位アミノ酸の $\alpha$ 炭素にアルキル、アラルキル基が結合してもよい。

【0060】

(3) AA3の好ましい態様；アミノ酸又はペプチド。例えば、Phe又は配列番号2又は3記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から4番目のPheから28番目のArgまでのアミノ酸配列を有するペプチド若くは当該配列のカルボキシル末端側のアミノ酸が、配列番号2又は3記載のアミノ酸配列においてアミノ末端から5番目のLeuまで1つずつ欠失したペプチド。例えば

Phe Leu、  
Phe Leu Ser、  
Phe Leu Ser Pro、  
Phe Leu Ser Pro Glu、  
Phe Leu Ser Pro Glu His、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys、  
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
Pro、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
Pro Ala、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
Pro Ala Lys、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
Pro Ala Lys Leu、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
Pro Ala Lys Leu Gln、

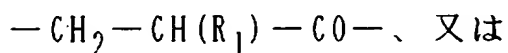
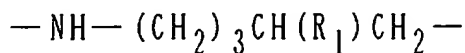
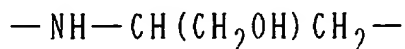
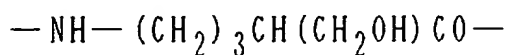
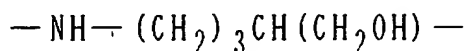
Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
Pro Ala Lys Leu Gln Pro、又は、

Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro  
Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg、

がAA3の例として挙げられる。

### 【0061】

又さらに、AA3の例示において、アミノ酸はL-アミノ酸でもD-アミノ酸でもよいことはいうまでもない。又、AA3の上記例示において、例えば1～数個のアミノ酸（好ましくはアミノ酸配列の約3分の1程度まで）は、非天然アミノ酸又は非アミノ酸単位、例えば



（上記式中 $\text{R}_1$ は前記と同意義）

で置き換えられてもよい。上記式で示される基がAA3に複数個あり、しかも $\text{R}_1$ で

【0062】

又、さらに、AA3の例示における各アミノ酸のいずれも上記 $R_1$ で示される置換基を有してよい。AA3で示される基において、 $R_1$ が複数個存在する時は、それらは同一であっても異なってもよい。

【0063】

以下にペプチドを構成するアミノ酸が側鎖に水酸基、メルカプト基、イミノ基又はアミノ基を有する場合の当該側鎖の好ましい例を示す。なお、以下のRは炭素数1以上の飽和又は不飽和アルキル鎖を示す。かかるアルキル鎖はXで示される上記のアルキル鎖と同意義でよい。

ア) Serの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$ 、

イ) homoSerの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{R}$ 、

ウ) Cysの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}$ 、

エ) homoCysの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CO}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{R}$ 、

オ) Aspの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$ 、

カ) Gluの側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$

キ) Lysの側鎖； $-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}$ 、

ク) アミノアジピン酸の側鎖； $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-\text{R}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{NH}-\text{R}$

ケ) オルニチンの側鎖； $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{CO}-\text{R}$

コ) 側鎖がアルキル鎖のアミノ酸であるAla、Val、Leu、ホモロイシン、Ile、ホモイソロイシン、S-メチルシステイン、メチオニン、エチオニン、又はブチオニン等についても同様にアルキル基が上記のように式(2)で示される修飾されたアルキル基であってよい。

【0064】

又、さらに本発明は、配列番号2又は3のアミノ酸配列において、アミノ末端から13、14又は15番目までのアミノ酸からなる部分ペプチドを含有する細胞内カルシウムイオン濃度上昇剤もしくはGH分泌誘導剤も、好ましい実施の態様として含むものである。この場合の部分ペプチドを構成する各アミノ酸単位は必ずしも

化学修飾されている必要はない。

Patent 02-08-2002

PERIODIC

0024643 JP 000490

上記製剤は、上記部分ペプチドを例えば下記する公知の賦形剤及び添加剤と混合する等自体公知の製造方法によって容易に製造することができる。

### 【0065】

さらに又、本発明の好ましい実施の態様は下記のペプチド系化合物である。

なお、グレリン誘導体とは天然型グレリンの化学構造を一部改変したペプチド系化合物のことをいい、短鎖グレリンとは27ないし28アミノ酸からなる天然型グレリンの一部のアミノ酸が欠失して、27ないし28よりも少ないアミノ酸からなるペプチドのことをいう。また、n位のアミノ酸残基とはアミノ末端からn番目のアミノ酸残基のことを示し、グレリン(m-n)とは、グレリンのアミノ末端からm番目よりn番目までのアミノ酸配列を有するペプチドを示す。

### 【0066】

グレリン、あるいはその短鎖グレリン誘導体のアミノ末端アミノ酸は、該アミノ酸の $\alpha$ アミノ基が保護されていなければ、いずれのアミノ酸（天然型グレリンではアミノ末端アミノ酸はグリシン）でもよく、またD-体、L-体のいずれでもよいが、好ましくは、アラニン、バリン、アミノイソブタン酸などが好適である。

2位残基は、いずれのアミノ酸（天然型グレリンではセリン）でもよいが、好ましくは小さな側鎖を有するアラニン、セリン、ヒスチジン、ノルバリンあるいは非アミノ酸構造等が好適である。

1位と2位残基は、アミノ酸2残基に相当する $\delta$ -アミノ酸、例えば実施例で示した5-アミノペンタン酸や、5-アミノ-5-ジメチルペンタン酸、2,5-ジアミノペンタン酸等であってもよい。

### 【0067】

3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、D-体、L-体いずれでもよく、D-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよく、これらのいずれの組み合わせであってもよい。中でも、3位がL-体、或いは3位、4位ともL-体の組み合わせが好ましい。

好ましくは、D-体あるいはL-体のロイシン、バリン、ノルイソロイシン、

ニルアラニン、シクロヘキシルアラニン、およびこれらのD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸が好適である。

### 【0068】

3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、側鎖にアシル基（アルカニル基、アルケノニル基、又はアリールアルカニル基など）、アルキル基、あるいはアラルキル基で修飾が可能な官能基を有する、セリン、ホモセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アジピン酸、リジン、オルニチンなどが好適である。

これらの側鎖に反応性を有するアミノ酸は、D-体またはL-体のいずれでもよく、対応するD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよく、中でも、3位がL-体、或いは3位、4位ともL-体の組み合わせが好ましい。

また、アミノ酸側鎖に、カルバメイト、チオカルバメイト、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテル、若しくはチオエステル結合等を介し、アシル基、例えばアラカニル基（C2からC35、好ましくは6から18、より好ましくは8から12）、アルケノニル基（C2からC35、好ましくは6から18、より好ましくは8から12）、アリールアルカニル基（ベンゾイル、フェナセチル、フェニルブチル、ナフトイル、ナフチルアセチル、ナフチルプロピオニル基など）あるいは、アルキル基（C2からC35、好ましくは6から18、より好ましくは8から12）、若しくはアラルキル基（ベンジル、フェネチル、フェニルプロピル、フェニルブチル、フェニルペンチル、ナフチルメチル基等）が結合していてもよい。また、結合を介さずに、3位と4位の $\alpha$ 炭素に上記のアルキル基、アラルキル基が結合してもよい。

### 【0069】

5位以降のアミノ酸配列は、ヒトグレリン、ラットグレリンの5位ロイシンを基点に28位まで、いずれの長さの配列が4位のアミノ酸に付加してもよく、そのカルボキシル末端がアミド、あるいはメチルアミド、エチルアミド等のアルキルアミド、あるいはベンジルアミド、アダマンタンアミド、アダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドであるのが好ましい。



また、アルキルアミドあるいはアラルキルアミドに、さらにアミノ基、グアニジド基などの塩基性基を結合させてもよい。例えば、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$ などが挙げられる。

#### 【0070】

4位アミノ酸のカルボキシル基に、アルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよく、これら塩基性アミノ酸はD-体、L-体あるいはラセミ体、又はD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸のいずれかでであってもよい。

これらのアミノ酸のカルボキシル基が、アミド、あるいはメチルアミド、エチルアミド等のアルキルアミド、あるいはベンジルアミド、アダマンタンアミド、アダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドであってよい。

また、アルキルアミドあるいはアラルキルアミドに、更にアミノ基、グアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。例えば、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{CONHCH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$ などが挙げられる。

あるいは、4位アミノ酸のカルボキシル基が、アミド、あるいはメチルアミド、エチルアミド等のアルキルアミド、あるいはベンジルアミド、アダマンタンアミド、アダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドであってもよい。また、アルキルアミド、あるいはアラルキルアミドに、アミノ基、グアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。例えば、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{CONHCH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$ などが挙げられる。

#### 【0071】

前に記載の5位以降から28位までのいずれかのアミノ酸配列をグレリン(1-4)カルボキシル末端部に付加したカルボキシル末端部欠損グレリン誘導体、好ましくはグレリン(1-5)、グレリン(1-6)、グレリン(1-7)、グレリン(1-8)、グレリン(1-9)、グレリン(1-10)、グレリン(1-11)のカルボキシル末端アミノ酸は、D-体、L-体、又は対応するいずれかのD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。

また、5位以降から28位までのいずれかのアミノ酸配列をグレリン(1-4)カルボキシル末端部に付加したカルボキシル末端部欠損グレリン誘導体、好ましくはグレリン(1-5)、グレリン(1-6)、グレリン(1-7)、グレリン(1-8)、グレリン(1-9)、グレリン(1-10)、グレリン(1-11)のカルボキシル末端アミノ酸にアルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよい。

これら塩基性アミノ酸はD-体、L-体あるいはラセミ体、又はいずれかのD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。また、これらの塩基性アミノ酸にアミド、あるいはメチルアミド、エチルアミド等のアルキルアミド、あるいはベンジルアミド、アダマンタンアミド、アダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドが結合してもよい。アルキルアミド、あるいはアラルキルアミドは、アミノ基、グアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。例えば、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$ 等が挙げられる。

【0073】

とくに好ましくは、グレリン(1-5)、グレリン(1-6)、グレリン(1-7)のカルボキシル末端アミノ酸は、D-体、L-体、又は対応するいずれかのD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。

また、5、6、7位の残基にアルギニン、リジン、ヒスチジンなどの塩基性アミノ酸を付加してもよく、これらのアミノ酸はD-体、L-体あるいはラセミ体、又はいずれかのD-、あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。

また、これらの塩基性アミノ酸にアミド、あるいはメチルアミド、エチルアミド等のアルキルアミド、あるいはベンジルアミド、アダマンタンアミド、アダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドが結合してもよい。アルキルアミド、あるいはアラルキルアミドに、さらにアミノ基、グアニジド基などの塩基性基を結合してもよい。例えば、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、又は $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$ 等が挙げられる。

【0074】

上述のように天然の原料から単離されるが、又は組換えDNA技術及び／若くは化学的合成によって製造することができる。更にアミノ酸残基に修飾（例えば、アシル化）が必要な場合は自体公知の手段に従って修飾反応を施す。

#### 【0075】

本願発明に係るペプチドをコードするDNAを有する発現ベクターにより形質転換された宿主細胞を培養し、当該培養物から目的のペプチドを採取することにより得られる。当該宿主細胞を選択することにより、当該細胞内において目的のペプチドにアシル化等の修飾がされた化合物を得ることができる。また、当該ペプチドが修飾されていない場合は、必要に応じて公知の手段に従ってアシル化等の修飾反応を行う。アシル化反応にはリパーゼ等の酵素を用いることもできる。

#### 【0076】

遺伝子を組み込むベクターとしては、例えば大腸菌のベクター（pBR322、pUC18、pUC19等）、枯草菌のベクター（pUB110、pTP5、pC194等）、酵母のベクター（YEp型、YRp型、YIp型）、又は動物細胞のベクター（レトロウィルス、ワクシニアウィルス等）等が挙げられるが、その他のものであっても、宿主細胞内で安定に目的遺伝子を保持できるものであれば、いづれをも用いることができる。当該ベクターは、適当な宿主細胞に導入される。目的の遺伝子をプラスミドに組み込む方法や宿主細胞への導入方法としては、例えば、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に記載された方法が利用できる。

#### 【0077】

上記プラスミドにおいて目的のペプチド遺伝子を発現させるために、当該遺伝子の上流にはプロモーターを機能するように接続させる。本願発明において用いられるプロモーターとしては、目的遺伝子の発現に用いる宿主細胞に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する宿主細胞がEscherichia属の場合はlacプロモーター、trpプロモーター、lppプロモーター、λPLプロモーター、recAプロモーター等を用いることができ、Bacillus属の場合はSP01プロモーター、SP02プロモーター等を用いることができ、酵母の場合はGAPプロモーター、PH05プロモーター、ADHプロモーター等を用いることができ、動物

【0078】

上記のようにして得られた目的遺伝子を含有するベクターを用いて宿主細胞を形質転換する。宿主細胞としては細菌（例えば、Escherichia属、Bacillus属等）、酵母（Saccharomyces属、Pichia属、Candida属等）、動物細胞（CHO細胞、COS細胞等）等を用いることができる。培養時の培地としては液体培地が適当であり、当該培地中には培養する形質転換細胞の生育に必要な炭素源、窒素源等が含まれる。必要に応じてビタミン類、成長促進因子、血清などを添加する。

【0079】

脂肪酸修飾ペプチドを直接製造するためには、該ペプチドの前駆体ポリペプチドを適切な位置で切断できるプロセッシング・プロテアーゼ活性を有し、当該ペプチド中のセリン残基をアシル化できる活性を有する細胞が望ましい。このようなプロセッシング・プロテアーゼ活性およびセリンアシル化活性を有する宿主細胞は、当該前駆体ポリペプチドをコードするcDNAを含む発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、該形質転換細胞がCa上昇活性又はGH分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを産生することを確認することにより、選抜できる。

【0080】

培養後、培養物から本発明に係るペプチドを常法により分離精製する。例えば、培養菌体又は細胞から目的物質を抽出するには、培養後、菌体又は細胞を集め、これをタンパク質変性剤（塩酸グアニジンなど）を含む緩衝液に懸濁し、超音波などにより菌体又は細胞を破碎した後、遠心分離を行う。次に上清から目的物質を精製するには、目的物質の分子量、溶解度、荷電（等電点）、親和性等を考慮して、ゲル濾過、限外濾過、透析、SDS-PAGE、各種クロマトグラフィーなどの分離精製方法を適宜組み合わせて行うことができる。

【0081】

本発明に係るペプチド化合物は常法により化学合成することができる。例えば、保護基の付いたアミノ酸を液相方及び／又は固相法により縮合、ペプチド鎖を延長させ、酸で全保護基を除去し、得られた粗生成物を上記の精製方法で精製す

ることにより得られる。アシル化酵素又はアシル基転移酵素（アシル化酵素）  
にあるアミノ酸の側鎖をアシル化することもできる。

## 【0082】

ペプチドの製造法は従来既に種々の方法が充分に確立されていて、本発明のペプチド系化合物の製造もそのような自体公知の方法に従って容易に製造できる。例えば古典的なペプチド合成法に従ってもよいし、固相法に従ってもよい。

以下に、組換えDNA技術と化学合成を併用した本発明に係るペプチド化合物の製法について例を挙げる

具体例：

アミノ末端部ペプチドの活性エステル、例えば、(1) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Osu、(2) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Phe-Osu、又は(3) Boc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Phe-Leu-Osuを化学合成し、各々、組換えDNA技術により生産したカルボキシル末端部ペプチドである(4) FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR、(5) LSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR、又は(6) SPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRとを結合、即ち、(1)と(4)、(2)と(5)及び(3)と(6)を結合させて、28個のアミノ酸からなるペプチド化合物を得る。より具体的には、XXXXZSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPRを大腸菌で発現させ、Boc<sub>2</sub>(O)でアミノ基を保護し、Boc-XXXXZSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPRを得る。次にアミノ酸乙のカルボキシル末端に選択的な酵素で切り出し、NH<sub>2</sub>-SPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPRに変換する。この化合物とBoc-Gly-Ser(Bu)-Ser(R)-Osuを中性から弱アルカリ水溶液中で混合し、得られるBocGlySer(Bu)Ser(R)FLSPEHQRVQQRK(Boc)ESK(Boc)K(Boc)PPAK(Boc)LQPRをトリフルオロ酢酸処理すれば目的物が得られる。上記アミノ酸の一文字標記は、1997年12月10日、株式会社ニュートンプレス発行の「細胞の分子生物学第3版」の記載に従った。

## 【0083】

本願発明のペプチド系化合物の塩としては薬学的に許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性又は酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩；カルシウム塩、マグ

ナトリウム塩などのアルカリ土類金属塩：ならびにアルミニウム塩、アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリエチルアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマル酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。これらの塩の中でもナトリウム塩、カリウム塩が最も好ましい。

#### 【0084】

本願発明のペプチド系化合物又はその薬理学的に許容しうる塩は毒性が低く、GH分泌誘導作用を有し、そのままもしくは自体公知の薬理学的に許容しうる担体、賦形剤、増量剤などと混合して哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対して用いることができる。投与量は成人に静脈注射する場合1日0.01～5mg/kgであり、好ましくは0.04～1.5mg/kgである。この量を1日1回～3回投与するのが望ましい。本願発明のペプチド系化合物は、薬学的に許容される担体と配合し、錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤などの固形製剤；又はシロップ剤、注射剤などの液状製剤として経口又は非経口的に投与することができる。

#### 【0085】

薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、固形製剤における賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤；液状製剤における溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。

また必要に応じて、防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤などの製剤添加物を用

【0086】

賦形剤の好適な例としては、例えば乳糖、白糖、D-マンニトール、デンプン、結晶セルロース、軽質無水ケイ酸などが挙げられる。滑沢剤の好適な例としては、例えばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸カルシウム、タルク、コロイドシリカなどが挙げられる。

結合剤の好適な例としては、例えば結晶セルロース、白糖、D-マンニトール、デキストリン、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドンなどが挙げられる。

崩壊剤の好適な例としては、例えばデンプン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、カルボキシメチルスターチナトリウムなどが挙げられる。

【0087】

溶剤の好適な例としては、例えば注射用水、アルコール、プロピレングリコール、マクロゴール、ゴマ油、トウモロコシ油などが挙げられる。

溶解補助剤の好適な例としては、例えばポリエチレングリコール、プロピレングリコール、D-マンニトール、安息香酸ベンジル、エタノール、トリスアミノメタン、コレステロール、トリエタノールアミン、炭酸ナトリウム、クエン酸ナトリウムなどが挙げられる。

懸濁化剤の好適な例としては、例えばステアリルトリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウム、ラウリルアミノプロピオン酸、レシチン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、モノステアリン酸グリセリン、などの界面活性剤；例えばポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロースなどの親水性高分子などが挙げられる。

【0088】

等張化剤の好適な例としては、例えば塩化ナトリウム、グリセリン、D-マンニトールなどが挙げられる。

無痛化剤の好適な例としては、例えばベンジルアルコールなどが挙げられる。

防腐剤の好適な例としては、例えばパラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、デヒドロ酢酸、ソルビン酸などが挙げられる。

抗酸化剤の好適な例としては、例えば亜硫酸塩、アスコルビン酸などが挙げられる。

### 【0089】

上記医薬組成物は、GHの投与による効果と同等以上の効果をもたらし、GHの投与によって起こる様々な副作用も低減できる。

当該医薬組成物の適用可能な疾患又はその効果は、GH欠損又は低下が関係するものとして、例えば、小人症、正常人での骨芽細胞及び骨再構成の活性化、GH欠乏症成人での筋肉量及び筋力の増強、GH欠乏症成人での運動能力の向上、小児の重度火傷治癒、排卵誘発におけるゴナドトロピンとの併用、ブレドニゾン投与によるタンパク質代謝異常の予防、重度免疫不全症におけるT細胞「教育」の促進、老人性の体重減少、脂肪組織拡大及び皮膚萎縮を抑制する効果などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。

また、GH欠損又は低下と直接関係しない疾患又は効果としては、例えば実施例7に記載したように、当該医薬組成物は拍動量の増加効果があるから、心不全等の心疾患の治療に効果がある。当該医薬組成物の効果はヒトには限らない。すなわち、動物の成長促進、食肉中の脂身の低減等、GH投与と同等以上の効果がある。

### 【0090】

また上記医薬組成物は以下のような疾患の治療又は身体状態の改善に効果がある。

高齢者における成長ホルモン放出の刺激処置、糖質コルチコイドの異化副作用の予防、オステオポロシスの予防と治療、免疫系の刺激、損傷治癒の促進、骨折修復の促進、成長遅滞の治療、成長遅滞に起因する腎不全もしくは機能不全の



不足状態の治療、肥満および肥満に関連した成長遅滞の治療、ターナー症候群およびターナー症候群に関連した成長遅滞の治療、火傷患者の回復の促進および入院の削減、子宮内発育遅滞、骨格形成異常、高コルチコイド症およびクッシング症候群の治療、拍動性成長ホルモン放出の誘導；ストレス患者における成長ホルモンの代用、骨軟骨形成異常、ヌーナン症候群、精神分裂病、うつ病、アルツハイマー病、遅延損傷治療および心理社会的剥奪の治療、肺機能不全および呼吸器依存症の治療、大手術後のタンパク質異化反応の減衰、癌やエイズ（AIDS）のような慢性疾患によるタンパク質損失および悪液質の減少、膵島細胞症を含む高インスリン血症の治療、排卵誘発のためのアジュバント療法、胸腺の発育を刺激するためおよび加齢に伴う胸腺機能の衰退を防ぐため、免疫抑制患者の治療、筋肉強度、運動性の向上、高齢者における皮膚の厚さ、代謝恒常性、腎恒常性の維持、骨芽細胞、骨再造形および軟骨成長の刺激。

また動物においても以下のような効果が期待される。動物の成長の速度増加、動物の乳生産もしくは獣毛生産増加、ペット動物における免疫系の刺激、ペット動物における高齢疾患の治療、家畜の成長促進並びにヒツジにおける増毛。

### 【0091】

本願発明によるCa上昇活性又はGH分泌誘導活性を有する脂肪酸修飾ペプチドを抗原とする抗体は、公知の方法により取得できる。当該抗体は、モノクローナル抗体あるいはポリクローナル抗体のいずれでもよく、それらの取得についても公知の方法が利用できる。また、これらの抗体を用いた脂肪酸修飾ペプチドの測定方法および当該測定法を利用した測定キットの作成も公知の方法が利用できる。

### 【0092】

#### 【実施例】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法は特に断らない限り、Molecular Cloning (Sambrook et al., 1989) に依った。

### 【0093】

実施例 1. GHS-R発現細胞株の作製とCa上昇活性の測定

GH分泌誘導因子（GHS）がGHSレセプター（GHS-R）に結合することによって生

ズル細胞内カルシウムイオン濃度の上昇（Ca上昇活性）をアッセイするために、以下のようしてラットGHS-Rを発現している細胞株を作製した。ラットGHS-Rの全長cDNAは、ラット脳由来のcDNAを鋳型にして、RT-PCR（逆転写酵素—ポリメラーゼチェーンリアクション）によって取得した。公知のラットGHS-Rの塩基配列 [K. McKee, et al. Molecular Endocrinology 11, 415-423 (1997).] から、以下の塩基配列からなるセンスおよびアンチセンスプライマーを合成した。

センスプライマー： 5'-ATGTGGAACGCGACCCCCAGCGA-3'

アンチセンスプライマー： 5'-ACCCCCAATTGTTTCCAGACCCAT-3'

【0094】

増幅されたcDNAをベクターpcDNAIII（Invitrogen社）に繋ぎ、発現ベクターGHSR-pcDNAIIIを作製した。当該発現ベクターでCHO細胞を形質転換し、GHS-Rを安定に発現している形質転換細胞を $1\mu\text{g/ml}$ のG418を含有する培地で選択した。選択された細胞株CHO-GHSR62は、 $10^{-10}\sim 10^{-9}\text{ M}$ のGHRP-6（Growth Hormone-Releasing hexapeptide）に応答した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化（Ca上昇活性）は、FLIPRシステム（Molecular Device社）で測定した。測定前に、 $4 \times 10^4$ のCHO-GHSR62細胞を壁面が黒い96穴マイクロプレート（Corning社）に植え、12～15時間培養した。細胞を $4\mu\text{M}$ の蛍光色素Fluo4（Molecular Probe社）と1時間保持し、20 mM HEPESと2.5 mM プロベネシドを含むHank's BSSで4回洗浄し、試料を添加して蛍光の変化を測定することによって、Ca上昇活性をアッセイした。

【0095】

## 実施例 2. 内在性GH分泌誘導ペプチドの精製

実施例 1 に記載した CHO-GHSR62細胞用いて、ラット由来の各種組織・臓器について、Ca上昇活性を調査した結果、ラット胃由来のペプチド抽出物が0.5 mg相当でも強いCa上昇活性を有することがわかった。そこで、数種類のクロマトグラフィーを用いて、ラット胃抽出物から以下の方法でCa上昇活性を有するペプチドを精製した。

【0096】

新鮮なラットの胃40 gを、混在するプロテアーゼを失活するために、5倍量の沸騰水中で5分間煮沸した。冷却後、煮沸した試料を1M AcOH-20 mM HClに調整

ポリトロン・ミキサーを用いてペプチドを抽出した。抽出液を11,000 rpmで30分間遠心し、上清をエバポレーターで約40 mlに濃縮した。濃縮液にアセトンを66%になるように添加して、アセトン沈殿を行い、生じた沈殿を除去した後、上清のアセトンを蒸発させた。上清を、0.1% TFA（トリフルオロ酢酸）で平衡化した10 gのSep-Pak C18 カートリッジ（Waters 社製）に加え、10% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFAで洗浄後、60% CH<sub>3</sub>CN/0.1% TFAで溶出した。溶出液の溶媒を蒸発後、凍結乾燥を行った。試料を1M AcOHに溶解して、1M AcOHで平衡化したSP-Sephadex C-25（H<sup>+</sup>型）に吸着させた。1M AcOH、2Mピリジンおよび2M ピリジン-AcOH（pH 5.0）で段階的に溶出することによって、SP-I、SP-IIおよびSP-IIIの3つの画分を、それぞれ得た。SP-III画分をSephadex G-50ゲル濾過カラムに掛け、各々の画分の一部についてCHO-GHSR62細胞を用いたCa上昇活性のアッセイを行った。Sephadex G-50カラムクロマトグラフィーの結果を図1aに示したが、分子量約3,000に相当する活性画分（図1a中、フラクション43-48）を、TSK CM-2SWカラム（4.6 x 250 mm、Tosoh社製）を用いpH 6.4で、CM-イオン交換によるHPLC（高速液体クロマトグラフィー）で分画した。CM-HPLCでの活性画分を、同一カラムを用い、pH 4.8で二次CM-HPLCで分画した（図1b）。活性画分（図1b中、溶出時間55-56分）を、μ Bondasphere C-18カラム（3.9 x 150 mm、Waters社製）を用いた逆相HPLCで単一にまで精製した。40 gのラットから16 μgのCa上昇活性を有するペプチドを精製し、グレリン（ghrelin）と命名した。

### 【0097】

#### 実施例3. グレリンの構造解析

精製したラット由来のグレリンのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー（ABI 494、Applied Biosystems社）で決定した。グレリンは、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg（Xaaは未同定アミノ酸）の配列からなる28アミノ酸残基で構成されるペプチドであった。XaaはラットcDNAの塩基配列からSerであり、当該ペプチドにおいてはSerが何らかの修飾を受けていることが推定された。そこで、アミノ末端から3番目のセリンが修飾されていない非修飾グレリンをペプチド合成機（ABI 433A、Applied Biosystems社）で化学合成した。非修飾合成グレ

ので、非修飾合成グレリンは天然型グレリンよりも著しく親水性であることがわかった。以上の結果から、天然型グレリンのアミノ末端から3番目のセリン(セリン3)は疎水性の残基で修飾されていることがわかった。

# 【0098】

セリン3の修飾基を明らかにするために、精製したグレリンを電子スプレーイオン化マス分析機(ESI-MS)分析した。観測された天然型グレリンの分子量( $3314.9 \pm 0.7$ )は、cDNAの塩基配列から得られた非修飾グレリンペプチドの分子量( $3188.5$ )よりも約126大きかった。以上の結果から、天然型グレリンはセリン3の水酸基がn-オクタノイル(C8:0)脂肪酸で修飾されていると推定された。このことを確認するために、n-オクタノイル(C8:0)グレリンペプチドを化学合成して、逆相HPLCでの溶出時間を調べた。n-オクタノイル(C8:0)ペプチドの化学合成は、セリン3の水酸基以外の全ての官能基を保護したペプチドをペプチド合成機(ABI 433A、Applied Biosystems社)を用いてFmoc固相法で合成し、セリン3の水酸基を4-(ジメチルアミノ)ピリジンの存在下で、n-オクタン酸とエチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドでアシル化して合成した。合成したn-オクタノイルペプチドは精製した天然型グレリンと同一の溶出時間であった(図2a)。さらに、合成n-オクタノイルペプチドおよび天然型グレリンをキモトリプシン処理によって得られる、アミノ末端から4番目までのペプチド断片(Gly1-Phe4)は、逆相HPLCで同一の溶出時間を示した。以上の結果から、ラット由来の天然型グレリンは配列番号2に記載のアミノ酸配列を有し、セリン3の水酸基がn-オクタン酸(カプリル酸)でアシル化された構造(図2c)であると結論された。

# 【0099】

また、ヒトグレリンをヒト胃抽出物から精製し、その構造が配列番号3に記載したアミノ酸配列を有し、アミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基がn-オクタン酸(カプリル酸)でアシル化された構造であることがわかった(図4a)。なお上記ラット及びヒト由来のグレリンの構造は、図1b中の活性画分のうち最初のピーク画分(溶出時間55-56分)精製したものの構造であるが、図1bの他の活性

修飾している脂肪酸はカプリル酸 (C8:0) 以外に、カプリル酸のモノエン酸 (C8:1)、カプリン酸 (C10:0) およびそのモノエン酸 (C10:1)、およびラウリル酸 (C12:0) およびそのモノエン酸 (C12:1) があることがわかった。

### 【0100】

また、ニワトリ、ウナギ及びカエルのグレリンを実施例2と同様にして胃抽出物から精製し、さらに実施例3と同様にして構造解析した。その構造は、ニワトリのグレリンは配列番号25に記載したアミノ酸配列、ウナギのグレリンは配列番号26に記載したアミノ酸配列、カエルのグレリンは配列番号27に記載したアミノ酸配列を有し、いずれもアミノ末端から3番目のセリン側鎖の水酸基がn-オクタン酸 (カプリル酸) でアシル化された構造であることがわかった。

### 【0101】

#### 実施例4. グレリンのCa上昇活性

天然型グレリンおよびn-オクタノイル修飾合成グレリンはCa上昇活性を有していたが、非修飾合成グレリンはCa上昇活性を示さなかった (図2b)。また、n-オクタン酸又はn-オクタン酸と非修飾合成グレリンの混合物はCa上昇活性を示さなかったことから、天然型グレリンのn-オクタン酸基はCa上昇活性に重要な構造であることがわかった。以後、グレリンとは [0-n-オクタノイル-セリン3]-グレリン (図2c) のことを示す。

### 【0102】

グレリンは、CHO-GHSR62細胞において、GHRP-6よりも高い細胞内カルシウムイオン濃度を上昇させる活性 (Ca上昇活性) を示したが、GHRH (GH放出ホルモン、図3aではGRF) はCa上昇活性を示さなかった (図3b)。グレリンのCa上昇活性は  $10^{-11}$  Mから認められ、 $EC_{50}$  は2.5 nMであった。GHS-Rの特異的アンタゴニストである [D-Lys 3]-GHRP-6 [R. G. Smith, et al., Science 260, 1640-1643 (1993)]  $10^{-4}$  Mの存在下で、グレリンによるCa上昇活性は抑制され、高濃度のグレリンで、アンタゴニスト非存在下でのCa上昇活性に回復する (図3b)。以上の結果は、グレリンのCa上昇活性がGHS-Rの特異的アンタゴニストによって拮抗的に阻害されることを示している。

## 実施例5. グレリン前駆体cDNAとその各種臓器での発現

グレリンのアミノ酸配列は公知のいかなるペプチドのアミノ酸配列とも相同性を示さなかったが、GenBankデータベースをホモロジー検索したところ、ラットEST (Expressed Sequence Tag) 配列の1つ (GenBank 受理番号A1549172) に同一の配列が認められた。このEST配列を基に以下のPCRプライマーを合成した。

センスプライマー: 5'-TTGAGCCCAGAGCACCAGAAA-3'

アンチセンスプライマー: 5'-AGTTGCAGAGGAGGCAGAAGCT-3'

## 【0104】

ラット胃由来のcDNAを鋳型に上記の2つプライマーを用いてRT-PCRを行った。PCRの条件は、1サイクルが98℃で10秒間、55℃で30秒間、72℃で1分間を、35サイクル行った。増幅されたDNA断片をプローブとして、ラット胃cDNAライブラリーをスクリーニングした。約 $2 \times 10^5$ の組換えファージをスクリーニングして、ラット由来グレリンをコードする全長cDNAを取得した。

## 【0105】

ラットグレリンcDNAは、配列番号6に記載した501塩基からなり、117アミノ酸 (図4a) からなるグレリン前駆体 (prepro-ghrelin) をコードしていた。グレリン前駆体のアミノ末端の23アミノ酸残基はシグナルペプチドの性質を備えていた。グレリンはグリシン24から始まり、成熟型グレリンの最後の2つのアミノ酸 (Pro-Arg) は、プロテアーゼによる切断を受ける配列であった。

## 【0106】

ラットグレリンcDNAを用いて、低ストリンジент条件でヒト胃cDNAライブラリーをスクリーニングして、全長ヒトグレリンcDNAを取得した。ヒト胃cDNAライブラリーは、ヒト胃poly(A)<sup>+</sup>RNA (Clontech社) から、cDNA合成キット (Pharmacia社) を用いて作製した。取得した全長ヒトグレリンcDNAは、配列番号7に記載した511塩基からなり、117アミノ酸 (図4a) からなるヒトグレリン前駆体 (prepro-ghrelin) をコードしていた。ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列は、82.9%の同一性を示し、グレリンは生物種間で高度に保存されていることが判明した。

グレリンの組織間分布を知るために、ラットの種々の組織から単離されたpoly(A)<sup>+</sup>RNAを解析した(図4b)。ラット組織のノザンブロット解析によって、0.62 kbのグレリン前駆体mRNAが胃に認められた。心室(Ventricle)にも2本のかすかなバンドが認められたが、これらは6.2 kbおよび1.2 kbのmRNAで、胃でのmRNAよりも大きく、胃とは異なったmRNAのスプライシングが推定された。以上の結果からグレリンの主な発現部位は胃であることがわかった。

## 【0108】

## 実施例6. グレリンの下垂体ホルモン分泌への効果

グレリンがGH分泌誘導活性を有しているかをin vitroおよびin vivoで調べた。まずin vitroでのアッセイとして、下垂体前葉の初期培養細胞へのグレリンの効果を調べた。4週令の雄SDラットから下垂体前葉を採取し、コラゲナーゼ処理で分散させた後、細胞を集め、10%FCS(ウシ胎児血清)と抗生物質を含むDMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium)培地で2回洗浄し、DMEM培地に懸濁して、下垂体前葉初期培養細胞を調製した。 $5 \times 10^4$ の細胞を、ポリ-D-リジンでコートした96穴の細胞培養プレートに植え、3~4日培養した。培養液を0.1 mlの試料を含有するDMEM培地と交換し、37℃で15分間保持した。培養液の一部を採取して、ラジオイムノアッセイによって、培養液中の各種下垂体ホルモンの濃度を測定した。下垂体ホルモンのうち、GH、FSH、LH、PRL、TSHはBiotrak/Amersham社製のキットを用い、ACTHはPeninsula Laboratories社製の高感度EIAキットを用いた。

## 【0109】

グレリンを下垂体前葉初期培養細胞に添加すると細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が認められ、非修飾合成グレリンでも弱いながらもCa上昇活性が認められた(図5a)。この結果は、グレリン及び非修飾合成グレリンが下垂体細胞に直接作用することを示している。次に、下垂体前葉初期培養細胞を用いてグレリンがGH分泌誘導活性を調べたところ、 $10^{-6}$  Mのグレリンの添加により、培養液中のGH濃度だけが濃度依存的に増加し、他の下垂体ホルモン(FSH、LH、PRL、TSH)の濃度増加は認められなかった(図5b)。

グレリンのGH分泌誘導活性をin vivoで調べた。合成グレリン10  $\mu$ gを雄ラット(250 g)の静脈に注射後、60分まで経時的に血液を採取して、血漿中の下垂体ホルモンの濃度を上記ラジオイムノアッセイによって測定した。下垂体ホルモンの内、GHだけが血液中に放出され、グレリンの静脈注射後5~10分で最高値に達した。この結果から、胃から血液中に放出されたグレリンが下垂体前葉細胞に作用し、血液中にGHを放出することがわかり、グレリンが未同定だった特異的な内在性GH分泌誘導物質であることが確認された。

## 【0111】

## 実施例7. ラットでの心拍出量増加

麻酔下ラットを用いて心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を調べた。体重220-250gのWistar系雄性ラット(ケアリー)を用い、心血管系に及ぼすグレリン急性投与の効果を検討するためラットを無作為に4群(10, 1, 0.5, 0.2  $\mu$ g投与群)に分けた。グレリンは生理食塩水で希釈し、ラット1匹あたりの投与量を、10、1、0.5、0.2  $\mu$ gに調整して、心拍出量測定のため右総頸静脈に挿入したインジェクションチューブ(PE50)から120  $\mu$ l急性投与した。

## 【0112】

動力学的指標として全身血圧、心拍出量を測定し、さらに末梢血管抵抗値を算出した。ラットをベントバルビタールで麻酔後、背位に固定した。平均血圧測定のために、右大腿動脈にヘパリンで満たしたポリエチレンカニューレ(PE50)を挿入した。心拍出量の測定は熱希釈式心拍出量計(CARDIOTHER M500R)を用いて測定した。右総頸静脈に生理食塩水で満たしたインジェクションチューブ(PE50)を挿入し、右心室内で留置した。右総頸動脈からマイクロカテーテルを挿入し、大動脈起始部に留置した。注入液は室温(25℃)の生理食塩水100  $\mu$ lを用いた。熱希釈式心拍出量計のMEASUREスイッチを押すと同時に注入液(生理食塩水100  $\mu$ l)を注入し、心拍出量を測定した。測定は5回行いその平均値を心拍出量とした。平均血圧および心拍出量は、グレリン投与前、投与後1、5、15、30分の値を測定した。末梢血管抵抗は平均血圧を心拍出量で除して算出した。

## 【0113】



	体重 (g)	グレリン1 $\mu$ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	230	347	382	367	341	338
SEM	3.7	14.3	10.2	11.5	7.9	8.8

【0114】

【表 2】

	体重 (g)	グレリン10 $\mu$ g投与後の心拍出量 (ml/min/kg)				
		0分	1分	5分	15分	30分
平均	237	350	390	392	370	344
SEM	1.0	8.5	7.4	15.8	14.7	13.8

グレリン1 $\mu$ g投与群（表1）及びグレリン10 $\mu$ g投与群（表2）において、投与後1分及び5分で、心拍出量の増加が認められた

【0115】

実施例8. 各種起源からのグレリンおよびグレリン-27の単離

ラット胃抽出物から実施例2に記載した方法でCa上昇活性を指標にグレリンを精製した。二次CM-HPLCでの活性画分（図1b中、溶出時間59分）を、 $\mu$ Bondasphere C-18カラム（3.9 x 150 mm、Waters社製）を用いた逆相HPLCで単一にまで精製した。この画分を電子スプレーイオン化マス分析機（ESI-MS）分析した結果、分子量（3187.2 $\pm$ 0.9）のピークが観測されたが、この値は28アミノ酸からなりオクタン酸（C8）修飾された天然型グレリンよりも約126小さかった。このペプチドのアミノ酸配列をペプチド・シーケンサー（ABI 494、Applied Biosystems社）で決定したところ、Gly Ser Xaa Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg（Xaaは未同定アミノ酸）の配列からなる27アミノ酸残基で構成されるペプチドであった。すなわち

、実施例 9 に示すように 28 アミノ酸のグレリンと同様であることから、グレリン-27 と命名した。ヒトの胃抽出物からも、ラットの場合と同様にヒト・グレリン-27 を単離し、配列番号 1 1 記載のアミノ酸配列からなることを確認した。なお、上記二次CM-HPLCで64-65分にあるピーク画分を精製し、電子スプレーイオン化マス分析機（ESI-MS）分析した結果、分子量（3341.4±0.9）のピークが観測された。この脂肪酸修飾ペプチドは28アミノ酸からなることから、グレリン（28アミノ酸）のアミノ末端から3番目のセリンがデカン酸（C10）で修飾されたものであることがわかった。

### 【 0 1 1 6 】

グレリン27前駆体をコードするcDNAを、実施例 5 で作成したラット胃cDNAライブラリーから、実施例 5 で作成したPCR増幅DNA断片をプローブとした、ブラックハイブリダイゼーションでクローニングした。cDNAの塩基配列を決定し、グレリン27前駆体をコードすることを確認した。得られたグレリン-27前駆体cDNAは、配列番号 1 4 記載の塩基配列からなり、配列番号 1 2 記載のアミノ酸配列を有する116アミノ酸からなるグレリン-27前駆体をコードしていた。また、上記と全く同様の方法でヒト・グレリン-27前駆体cDNAをクローニングし、配列番号 1 5 記載の塩基配列からなり、配列番号 1 3 記載のアミノ酸配列を有する116アミノ酸からなるヒト・グレリン-27前駆体をコードしていることがわかった。

### 【 0 1 1 7 】

ブタ由来のグレリンおよびグレリン-27の前駆体をコードするcDNAを、ブタcDNAライブラリーから実施例 5 に記載の方法によって、実施例 5 に記載のPCR増幅DNA断片をプローブとしたブラックハイブリダイゼーションでクローニングした。得られたcDNAクローンの塩基配列を決定し、ブタ・グレリン前駆体又はブタ・グレリン27前駆体をコードしていることを確認した。得られたブタ・グレリン前駆体cDNAは、配列番号 2 0 記載の塩基配列からなり、配列番号 1 8 記載のアミノ酸配列を有する118アミノ酸からなるグレリン前駆体をコードしていた。また、ブタ・グレリン-27前駆体cDNAは、配列番号 2 1 記載の塩基配列からなり、配列番

号10記載のアミノ酸配列を有する117アミノ酸からなるグレリン-27前駆体をコードしていた。従って、ブタ・グレリン（28アミノ酸）及びブタ・グレリン-27（27アミノ酸）は、各々、配列番号16および17記載のアミノ酸配列からなっている。

### 【0118】

ウシ・グレリン前駆体cDNAはPCR法によってクローニングした。すなわち、ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン及びグレリン-27で保存されているアミノ酸配列を基に設計した塩基配列を有する合成DNAをプライマーとして、ウシ胃cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行った。増幅されたDNA断片は配列番号24記載の塩基配列を有しており、配列番号23記載のウシ・グレリン-27前駆体の一部をコードしていた。従ってウシ・グレリン-27は配列番号22記載のアミノ酸配列を有している。また、ウシ胃cDNAライブラリーを鋳型とする上記PCRで増幅されたDNA断片中には、グレリン（28アミノ酸）前駆体をコードするDNAはなかった。

ラット、ヒトおよびブタ由来のグレリン、及びラット、ヒト、ブタおよびウシ由来のグレリン-27のアミノ酸は、非常によく似ており、特にアミノ末端から10番目までのアミノ酸配列は、上記7種のグレリンで完全に一致していた。

### 【0119】

#### 実施例9. 各種グレリン誘導体の活性比較

ラットおよびヒト由来のグレリンを各種プロテアーゼによる部分分解したペプチド断片、又は化学合成したペプチドのCa上昇活性を比較することにより、Ca上昇活性に必要なコア・アミノ酸配列および修飾脂肪酸の鎖長の最適値を求めた。Ca上昇活性は最大値の50%の活性を示すグレリンの濃度（EC50, nM）で表した。従って、EC50の値が低い程、活性が高いことになる。

### 【0120】

各種グレリン誘導体の活性比較

起源	配列番号	アミノ酸	脂肪酸修飾	Ca 上昇活性 (EC50, nM)	備考
ヒト	3	1-28	Acyl (C : 8)	2.6	天然型グレリン
ヒト	3	1-15	Acyl (C : 8)	7.0	
ヒト	3	1-11	Acyl (C : 8)	15	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 8)	2.9	天然型グレリン
ラット	2	1-15	Acyl (C : 8)	8.6	
ラット	2	1-11	Acyl (C : 8)	15	
ラット	2	1-10	Acyl (C : 8)	19	
ラット	2	1-9	Acyl (C : 8)	38	
ラット	2	1-8	Acyl (C : 8)	100	
ラット	2	1-4	Acyl (C : 8)	480	
ラット	2	16-28	Acyl (C : 8)	>10000	
ラット	2	(1-12)+ (14-28)	Acyl (C : 8)	2.8	グレリン-27
ラット	2	1-28	Acyl (C : 16)	3.1	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 10)	2.6	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 6)	16	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 4)	280	
ラット	2	1-28	Acyl (C : 2)	780	

【 0 1 2 1 】

グレリンのCa上昇活性は、アミノ末端側に存在する。アミノ末端から4番目のアミノ酸までのペプチドで十分なCa上昇活性はあるが、アミノ末端から10番目のアミノ酸までのペプチドであれば、天然型グレリンに近い、強いCa上昇活性がある。また修飾脂肪酸の鎖長について、C:2（アセチル基）であっても十分活性はあるが、C:8（オクタノイル基）でCa上昇活性が最高になり、その後脂肪酸の炭素数がC:10（デカノイル基）、C:16と増加しても強いCa上昇活性は変化しな

い、オナオチ、アミノ末端から3番目のグリシンを修飾している脂質誘導体、炭素数8以上であればCa上昇活性が最も強くなる。

## 【0122】

### 実施例10. 各種グレリン誘導体化合物の合成

#### (1) ペプチド誘導体合成

Fmoc-D-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)およびFmoc-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)以外のアミノ酸誘導体と合成試薬をパーキンエルマー社、あるいは渡辺化学(株)より購入した。ペプチド鎖の延長は主にパーキンエルマー社製アブライドバイオシステム431A 合成機を使用し、Boc法、あるいはFmoc法にて保護ペプチド誘導体-樹脂を構築した。Boc法にて得られた保護ペプチド樹脂は、p-クレゾール存在下、無水弗化水素(HF)で脱保護してペプチドを遊離させ、精製に供した。Fmoc法で得られた保護ペプチド樹脂はトリフルオロ酢酸(TFA)、あるいは種々のスカベンジャーを含む希釈TFAで脱保護し、遊離したペプチドを精製に供した。精製は、C4あるいはC18を用いた逆相HPLCにて実施した。精製品は、逆相HPLCにてその純度を確認し、アミノ酸組成分析および質量分析にて構造を確認した。

本発明品のペプチドは通常のペプチド合成法によって製造される。例えば、「生化学実験講座1 タンパク質の化学」第4巻の第2章、第3章(東京化学同人)、あるいは「続医薬品の開発14 ペプチド合成」(廣川書店)等の成書に記載されている方法によって製造が可能である。従って、本発明品のペプチドの代表的な合成例を以下に示した。具体的には、アシル化ペプチドの合成例とアルキル化ペプチドの合成例を示した。また、hGhrelinあるいはrGhrelinをトリプシン、あるいはキモトリプシン、あるいは両酵素を順番に作用させて、以下のグレリン断片(19. Ghrelin(16-28)、20. hGhrelin(1-15)、21. rGhrelin(1-15)、23. hGhrelin(1-11)、24. rGhrelin(1-11)、25. Ghrelin(1-10)、26. Ghrelin(1-9)、27. Ghrelin(1-8)、30. Ghrelin(1-4)を調製し、分析用HPLCで単離したものを活性測定に供した。41. [N-Acety]-Ghrelin(1-10)は、常法に従いGhrelin(1-10)をN-アセチルサクシンイミド'処理して調製した。化合物番号2. rat Ghrelinは天然物を使用、10. [Ser<sup>3</sup>(Butyryl)]-rGhrelin、11. [Ser<sup>3</sup>(Hexanoyl)]-rGhrelin、12. [Ser<sup>3</sup>(Decanoyl)]-rGhrelin、13. [Ser<sup>3</sup>(Lauroyl)]-rGhrelin、14

【 0 1 2 3 】

〔 主な略号 〕

HMP樹脂； 4-hydroxymethyl-phenoxymethyl樹脂

SAL樹脂； Super Acid Labile 樹脂 (4-(2',4'-dimethoxyphenyl-aminomethyl)phenoxycetamido-ethyl樹脂)

PAM樹脂； phenylacetoamidomethyl樹脂

HBTU； 2-(1H-bezotriazole-1-yl)-1,1,3,3,-tetramethyluronium hexafluorophosphate

HOBt； 1-hydroxybezotriazole

DCC； dicyclohexylcarbodiimide

DIPCl； diisopropylcarbodiimide

TFA； trifluoroacetic acid

DIEA； diisopropylethylamine

TIPS； triisopropylsilane

Fmoc； fluorenylmethoxycarbonyl

Boc； t-butyloxycarbonyl

Trt； trityl

Bu<sup>t</sup>； t-butyl

Pmc； 2,2,5,7,8-pentamethylchroman-6-sulfonyl

Prl； propionyl

Bzl； benzyl

Bom； benzyloxymethyl

Tos； toluenesulfonyl

Cl-Z； 2-chloro-benzyloxycarbonyl

DMF； N,N-dimethylformamide

NMP； N-methylpyrrolidone

DMAP； 4-dimethylaminopyridine

【 0 1 2 4 】

〔 合成に使用した保護アミノ酸 〕

Fmoc法 :

Boc-Gly, Fmoc-Gly, Fmoc-Ser( $\text{Bu}^t$ ), Fmoc-Ser(Trt), Fmoc-Glu( $\text{OBu}^t$ ), Fmoc-His(Boc), Fmoc-Gln(Trt), Fmoc-Arg(Pmc), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Pro, Fmoc-Leu, Fmoc-Ala, Fmoc-Val, Fmoc-Phe, Fmoc- $^D$ Phe, Fmoc-Ser( $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ ), Fmoc- $^D$ Ser( $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ ), Fmoc-Cys( $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ )

Boc法 :

Boc-Gly, Boc-Ser(Bzl), Boc-Ser(Ac), Boc-Ser(Prl), Boc-Glu(OBzl), Boc-His(Bom), Boc-Gln, Boc-Arg(Tos), Boc-Lys(Cl-Z), Boc-Pro, Boc-Leu, Boc-Ala, Boc-Val, Boc-Phe, Boc-Cys( $n\text{-C}_8\text{H}_{17}$ )

【 0 1 2 5 】

〔 使用した機器 〕

( a ) 分析用 H P L C システム

機器 ; 島津 LC-10A システム

カラム ; YMC PROTEIN-RP ( 4.6 mm  $\phi$  x 150 mm )

カラム温度 ; 40  $^{\circ}\text{C}$

溶出液 ; 0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル濃度を20分間で0%から50%に直線的に変化させた

流速 ; 1 mL/分

検出 ; UV (210 nm)

注入量 ; 10 ~ 100  $\mu\text{l}$

【 0 1 2 6 】

( b ) 分取用 H P L C システム

機器 ; Waters 600 Multisolvent Delivery System

カラム ; YMC-Pack-ODS-A ( 5  $\mu\text{m}$ , 20 mm x 250 mm )

YMC-Pack-PROTEIN-RP ( 5  $\mu\text{m}$ , C4, 10 mm x 250mm )

YMC-Pack PROTEIN-RP ( 5  $\mu\text{m}$ , C4, 20 mm x 250mm )

溶出液; 0.1%トリフルオロ酢酸中、適宜アセトニトリル濃度を直線的に変化させた。

流速; 10 mL/分 (内径20 mm カラム用)、3 mL/分 (内径10 mmカラム用)、1 mL/分 (内径4.6 mmカラム用)

検出; 210 nm, 260 nm

注入; 10 $\sim$ 2000  $\mu$ l、2000  $\mu$ l以上はポンプにより注入

### 【0127】

#### (c) 質量分析機

機器; フィニガンMAT TSQ700

イオン源; ESI

検出イオンモード; positive

スプレー電圧; 4.5kV

キャピラリー温度; 250 $^{\circ}$ C

移動相; 0.2%酢酸・メタノール混液 (1 : 1)

流速; 0.2 mL/分

スキャン範囲; m/z 300 $\sim$ 1,500

### 【0128】

#### (d) アミノ酸配列分析

機器; パーキンエルマー社製 アプライドバイオシステム 477A型シークエンサー

#### (e) アミノ酸組成分析

機器; 日立製作所製 L-8500型アミノ酸分析機計

試料; とくに記載のないものは、封管中、6M塩酸で110 $^{\circ}$ C、24時間加水分解した。

### 【0129】

(2) アシルセリンを有する誘導体の合成例 (Fmoc法、カルボキシル末端カルボン酸)

化合物1 hGhrelin: GSS(CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR



### 【0130】

(3) アシルセリンを有する合成例 (Fmoc法、カルボキシル末端アミド体)  
化合物3 Ghrelin(1-9)-NH<sub>2</sub>; GSS(CO-C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>)FLSPEH-NH<sub>2</sub>

Fmoc-SAL樹脂 (ABI社製、403 mg, 0.25 mmol) を20%ピペラジンで20分間処理したのち、順次HBTU/HOBtによるFmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱Fmocを繰り返し、Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Trt)-Phe-Leu-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-SAL樹脂を構築した。最後にDCC/HOBtにてBoc-Glyを導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (約550 mg) を1%TFA-5%TIPS-塩化メチレン溶液 (10 mL) で30分間処理した。ペプチド樹脂をろ取し、塩化メチレン (30mL) で数回洗浄した後、5%

01-03-2001  
ついで塩化メチレン(120 mL)で洗浄した。得られたHATU-protected peptide resin (約 750 mg) をNMP (10 mL)に膨潤させ、DMAP (61.1 mg, 0.5 mmol)存在下、オクタン酸 (144.2 mg, 1.0 mmol)、DIPCl (126.2 mg, 1 mmol)を加え4時間反応させた。樹脂をろ取し、NMP, 塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、3位セリン側鎖がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約800 mgを得た。このものに、TFA (10 mL)を加え、室温で30分間攪拌した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とした。沈殿をろ取、乾燥し、粗ペプチド 250 mgを得た。本品約200 mgを30%酢酸水10 mLに溶かし、YMC-Pack PROTEIN-RP (C4, 20 mm x 250mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から54%までの60分間直線グラジエント (流速:10 mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、150 mgの目的物を得た。

### 【0131】

#### (4) アシルセリンを有する合成例 (Boc法)

化合物9 [Ser<sup>3</sup>(Propionyl)]-hGhrelin(1-28): GSS(CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)FLSPEHQRVQQRKESK KPPAKLQPR

Boc-Arg(Tos)-Pamレジン (0.75 g, 0.5 mmol)より、保護ラットグレリン樹脂 (4-28) をBoc Chemistryで構築後、その半量1.4 gに、Boc-Ser(CO-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)-OH, Boc-Ser(Bzl)-OH, Boc-Gly-OHを縮合した。得られた樹脂1.5 gをHF:p-クレゾール (8.5 mL:1.5 mL)で0℃、一時間処理後、HFを減圧下留去した。残さにエーテルを加え671 mgの粗ペプチドを得た。このものを50% AcOHに溶かし、分取用カラムYMC-Pack-ODS-A (5 μm, 20 mm x 250 mm)に添加し、10 mL/minで0.1% TFAを含む溶液でアセトニトリル濃度を75分間で0から95%まで変化させて溶出した。目的物を含む画分を凍結乾燥して粗ペプチドを135.8 mg得た。この一部0.5 mgをYMC-A-302カラム (C18, 4.6 mm x 150 mm)に添加し、流速1 mL/minでアセトニトリル濃度を15%から19%まで変化させて溶出した。この精製操作を繰り返し、目的とする画分を合わせ目的物0.41 mgを得た。

### 【0132】

以下にアシルセリンを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

ESI-MS 3371.0 (理論値 3370.9), アミノ酸組成比: Ser; 3.53 (4), Glx; 5.91 (6), Gly; 1.02 (1), Ala; 1.00 (1), Val; 0.96 (1), Leu; 2, Phe; 1.06 (1), Lys; 3.90 (4), His; 0.97 (1), Arg; 2.87 (3), Pro; 3.87 (4)

## 【0133】

化合物3. Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]; 1085.7 (理論値 1085.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.45 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 0.99 (1), His; 1.08 (1), Pro; 0.97 (1)

## 【0134】

化合物4. [Ser<sup>2</sup>(Octanoyl), Ser<sup>3</sup>]-Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]; 1085.8 (理論値 1085.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.46 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), His; 1.09 (1), Pro; 0.97 (1)

## 【0135】

化合物5. [Ser<sup>2</sup>(Octanoyl)]-Ghrelin(1-9)-amide

ESI-MS [M+H]; 1211.7 (理論値 1211.4), アミノ酸組成比: Ser; 2.48 (3), Glx; 1.00 (1), Gly; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), His; 1.11 (1), Pro; 0.98 (1)

## 【0136】

化合物8. [Ser<sup>3</sup>(Acetyl)]-rGhrelin

ESI-MS 3231.0 (理論値 3230.7), アミノ酸組成比: Ser; 3.50 (4), Glx; 5.90 (6), Gly; 0.98 (1), Ala; 2.00 (2), Leu; 2, Phe; 1.01 (1), Lys; 4.97 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.99 (2), Pro; 3.99 (4)

## 【0137】

化合物9. [Ser<sup>3</sup>(Propionyl)]-rGhrelin

ESI-MS 3245.0 (理論値 3242.8), アミノ酸組成比: Ser; 3.42 (4), Glx; 5.93 (6), Gly; 1.00 (1), Ala; 2.00 (2), Leu; 2, Phe; 1.10 (1), Lys; 4.97 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.99 (2), Pro; 3.83 (4)

【0138】

化合物15. [Ser<sup>3</sup> (3-Phenylpropionyl)]-hGhrelin

ESI-MS 3377.0 (理論値 3376.9), アミノ酸組成比: Ser; 3.06 (4), Glx; 5.92 (6), Gly; 0.93 (1), Ala; 0.98 (1), Val; 0.99 (1), Leu; 2, Phe; 1.13 (1), Lys; 4.03 (4), His; 1.08 (1), Arg; 3.00 (3), Pro; 3.76 (4)

【0139】

化合物16. [Ser<sup>3</sup> (3-Octenoyl)]-hGhrelin

ESI-MS 3369.0 (理論値 3368.9), アミノ酸組成比: Ser; 3.59 (4), Glx; 5.91 (6), Gly; 1.00 (1), Ala; 1.02 (1), Val; 0.99 (1), Leu; 2, Phe; 1.15 (1), Lys; 3.97 (4), His; 0.98 (1), Arg; 2.93 (3), Pro; 3.88 (4)

【0140】

化合物28. Ghrelin(1-8)-amide

ESI-MS [M+H] 948.5 (理論値 948.1), アミノ酸組成比: Ser; 2.45 (3), Glx; 0.97 (1), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 0.97 (1)

【0141】

化合物29. Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H] 819.6 (理論値 819.0), アミノ酸組成比: Ser; 2.52 (3), Gly; 1.01 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1), Pro; 1.09 (1)

【0142】

化合物30. Ghrelin(1-6)-amide

ESI-MS [M+H]; 722.4 (理論値 721.8), アミノ酸組成比: Ser; 2.47 (3), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1)

【0143】

化合物31. Ghrelin(1-5)

ESI-MS [M+H] 636.5 (理論値 635.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.78 (2), Gly; 0.99 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1)

【0144】

化合物32. Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H] 635.4 (理論値 634.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.67 (2), Gly;

【0145】

化合物33. Ghrelin(1-4)-amide

ESI-MS [M+H] 522.2 (理論値 521.6), アミノ酸組成比: Ser; 1.65 (2), Gly ; 0.99 (1), Phe; 1

【0146】

化合物34. Ghrelin(1-3)-amide

ESI-MS [M+H] 375.2 (理論値 374.4), アミノ酸組成比: Ser; 1.66 (2), Gly ; 1

【0147】

化合物35. [Lys<sup>8</sup>]-Ghrelin(1-8)-amide

ESI-MS [M+H] 947.9 (理論値 947.1), アミノ酸組成比: Ser; 2.70 (3), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)

【0148】

化合物36. [Arg<sup>8</sup>]-Ghrelin(1-8)-amide

ESI-MS [M+H] 975.8 (理論値 975.2), アミノ酸組成比: Ser; 2.70 (3), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Arg; 0.99 (1), Pro; 1.00 (1)

【0149】

化合物37. [Lys<sup>6</sup>]-Ghrelin(1-6)-amide

ESI-MS [M+H] 763.6 (理論値 762.9), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2), Gly ; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Lys; 1.00 (1)

【0150】

化合物38. [Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H] 650.5 (理論値 649.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.79 (2), Gly ; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)

【0151】

化合物39. [<sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>, Lys<sup>5</sup>]-Ghrelin(1-5)-amide

ESI-MS [M+H] 650.5 (理論値 649.8), アミノ酸組成比: Ser; 1.79 (2), Gly ; 0.99 (1), Phe; 1, Lys; 0.99 (1)

化合物40. [N-Aminopentanoyl]-Ghrelin(3-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> 774.7 (理論値 774.0), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)

【0153】

化合物43. [N-Glycyl]-Ghrelin(3-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> 732.7 (理論値 731.9), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.01 (1), Pro; 1.00 (1)

【0154】

化合物44. [Leu<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> 845.7 (理論値 845.1), アミノ酸組成比: Ser; 1.80 (2), Gly; 1.01 (1), Leu; 2, Phe; 1.02 (1), Pro; 0.99 (1)

【0155】

化合物45. [His<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> 869.7 (理論値 869.0), プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃, 2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.02 (2), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), His; 0.95 (1), Pro; 0.99 (1)

【0156】

化合物46. [Lys<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> 860.7 (理論値 860.1), プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃, 2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.04 (2), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Lys; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

【0157】

化合物47. [Gly<sup>2</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup> 789.5 (理論値 788.9), プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃, 2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.14 (2), Gly; 2.01 (2), Leu; 1, Phe; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

【0158】

(4) アミノ末端アシル化誘導体の合成

化合物 6 [N-Octanoyl, Ser<sup>t</sup>]-Ghrelin(1-9)-amide; C<sub>7</sub>H<sub>15</sub>(CO-GSSFLSPH-NH)  
 Printed: 02-03-2002 PRIDOC-X 00946453-IP: 009430  
 Fmoc-SAL樹脂 (ABI社製、403 mg, 0.25 mmol) を20%ピペラジンで20分間処理

したのち、順次HBTU/HOBtによるFmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱Fmocを繰り返して、Fmoc-Gly-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Phe-Leu-Ser(tBu)-Pro-Glu(OBu<sup>t</sup>)-His(Boc)-SAL樹脂を構築した。ピペラジン処理後、得られたペプチド樹脂(550 mg)をNMPで洗浄し、HOBt(135.1 mg, 1 mmol)存在下、DIPCl(126.2 mg, 1 mmol)とオクタン酸(144.2 mg, 1.0 mmol)を加え4時間反応させた。樹脂をろ取り、NMP、塩化メチレンで洗浄し減圧下乾燥して、アミノ末端Glyアミノ基がオクタノイル化された保護ペプチド樹脂 約600 mgを得た。TFA(10 mL)で脱保護し(30分間処理)、粗ペプチド 200 mgを得た。全量をYMC-Pack PROTEIN-RP (5 μm, C<sub>4</sub>, 20 mm x 250mm)に添加し、0.1% トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から54%までの60分間直線グラジエント(流速:10 mL/min)で溶出させた。約180 mgの目的物を得た。

測定値 ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>: 1085.6 (理論値 1085.2)、アミノ酸組成比: Ser; 2.47 (3), Glx; 0.98 (1), Gly; 1.00 (1), Leu; 1, Phe; 1.02 (1), His; 1.09 (1), Pro; 0.96 (1)

【0159】

(6) 側鎖アルキルセリンを含む誘導体の合成例

化合物50. [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide; GSS(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)FLSP-NH<sub>2</sub>  
 Fmoc-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)

氷冷下、Boc-Ser (12.3 g, 53.9 mmol)のジメチルホルムアミド(300 ml)に溶液に水素化ナトリウム(3.19g, 133 mmol)を加え、室温で1.5時間攪拌した。この中に、ヨウ化オクタン(11.0 ml, 60.9 mmol)を加え、室温で16時間攪拌した。氷冷下、反応液に水(40 ml)を滴下した後、溶媒を減圧留去した。得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ゲル; Merck社製Art9385、溶出溶媒; ジクロロメタン: メタノール: 酢酸=120:10:1)に付して精製し、Boc-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)を淡黄色油状物として6.88 g (収率36.2%)得た。このBoc-Ser(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>) (6.88 g, 21.7 mmol)に氷冷下、トリフルオロ酢酸(120 ml)を加え、室温で0.5時間攪拌した。トリフルオロ酢酸を減圧留去した後、得られた残査をジエチルエーテル

。析出した結晶をろ取し、H-Ser( $C_8H_{17}$ )・HClを無色結晶として5.25 g(収率90.3%)得た。このH-Ser( $C_8H_{17}$ )・HCl(2.54 g, 10.0 mmol)の10%炭酸水素ナトリウム(50 ml)懸濁液にトリエチルアミン(1.40 ml, 10 mmol)を加えた後、この中にFmoc-OSu(5.00 g, 14.8 mmol)の1,2-ジメトキシエタン(20 ml)溶液を10分間かけて滴下し、室温で16時間攪拌した。不溶物をろ過し、ろ液にジクロロメタンを加え有機層を分離した後、13%食塩水で洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、溶媒を減圧留去した。得られた残査をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ゲル;富士シリシア社製BW-300、溶出溶媒;ジクロロメタン:メタノール=93:7)に付して精製し、Fmoc-Ser( $C_8H_{17}$ )を無色結晶として2.75 g(収率62.6%)得た。Rf=0.45( $CHCl_3$ :MeOH=9:1, Silica gel 60F<sub>254</sub>, MERCK) Fmoc-D-Ser( $C_8H_{17}$ ):Rf=0.45( $CHCl_3$ :MeOH=9:1, Silica gel 60F<sub>254</sub>, MERCK)

# 【0160】

[Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide; GSS( $C_8H_{17}$ )FLSP-NH<sub>2</sub>

Fmoc-SAL樹脂(ABI社製、400 mg, 0.25 mmol)を20%ピペラジンで20分間処理したのち、順次HBTU/HOBtによるFmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱Fmocを繰り返して、Fmoc-Ser( $Bu^t$ )-Ser( $C_8H_{17}$ )-Phe-Leu-Ser( $Bu^t$ )-Pro-SAL樹脂を構築した。最後にDCC/HOBtにてBoc-Glyを導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂から250 mgをとりTFA(10 mL)で30分間処理した。樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、残さにエーテルを加え沈殿とし粗ペプチド約120 mgを得た。本品を5% AcOH(10 mL)に溶かし、YMC-Pack-ODS-A(5  $\mu$ m, 20 mm x 250 mm)に添加し、0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%か60%までの60分間直線グラジエント(流速:10 mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、40 mgの目的物を得た。

# 【0161】

以下にアルキルセリンを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成分析結果をまとめた。

化合物17. [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-hGhrelin

ESI-MS ; 3357.0 (理論値; 3356.9)、アミノ酸組成比: Ser; 2.92 (3+1), Glx



5.04 (6), Gly; 1.00 (1), Ala; 0.98 (1), Val; 0.99 (1), Leu; 2.00 (1), Phe; 1.15 (1), Lys; 4.04 (4), His; 1.09 (1), Arg; 3.01 (3), Pro; 3.89 (4)

【0162】

化合物50. [Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 805.5 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃、2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 0.86 (2+1), Gly; 1.01 (1), Leu; 1.00 (1), Phe; 1.06 (1), Pro; 0.95 (1)

【0163】

化合物51. [Ser<sup>3</sup>(Octyl), D<sup>4</sup>Phe]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 805.4 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃、2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 0.97 (2+1), Gly; 1.00 (1), Leu; 1.00 (1), Phe; 1.05 (1), Pro; 1.16 (1)

【0164】

化合物52. [D<sup>3</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 805.4 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃、2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.51 (2+1), Gly; 1.00 (1), Leu; 1.00 (1), Phe; 1.00 (1), Pro; 1.00 (1)

【0165】

化合物53. [D<sup>3</sup>Ser<sup>3</sup>(Octyl), D<sup>4</sup>Phe]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]<sup>+</sup>; 805.5 (理論値 805.0)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃、2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 1.51 (2+1), Gly; 1.00 (1), Leu; 1.00 (1), Phe; 1.00 (1), Pro; 1.01 (1)

【0166】

(7) 側鎖アルキルシステインを含む誘導体の合成例

化合物48. [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-Ghrelin(1-7)-NH<sub>2</sub>; GSC(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)FLSP-NH<sub>2</sub>

Fmoc-SAL樹脂 (ABI社製、403 mg, 0.25 mmol) を20%ピペラジンで20分間処理したのち、順次HBTU/HOBtによるFmoc-アミノ酸導入とピペラジンによる脱Fmocを繰り返し、Fmoc-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Cys(C<sub>8</sub>H<sub>17</sub>)-Phe-Leu-Ser(Bu<sup>t</sup>)-Pro-SAL樹脂を構築した。最後にDCC/HOBtにてBoc-Glyを導入したのち、得られた保護ペプチド樹脂 (5

5.0 mg)を TEA (10 mL) で30分間処理した樹脂をろ去し、ろ液を濃縮後、  
さらにエーテルを加え沈殿とし粗ペプチド120 mgを得た。本品を5% AcOH(10 mL)に  
溶かし、YMC-Pack-ODS-A (5  $\mu$ m, 20 mm x 250 mm)に添加し、0.1% トリフルオ  
ロ酢酸中、アセトニトリル0%から60%までの60分間直線グラジエント(流速:10  
mL/min)で溶出させた。目的画分を分取後、凍結乾燥し、44 mg の目的物を得  
た。

#### 【0167】

以下にアルキルシステインを有するペプチド誘導体の質量分析、アミノ酸組成  
分析結果をまとめた。

化合物18. [Cys<sup>3</sup> (Octyl)]-rGhrelin

ESI-MS ; 3317.0 (理論値; 3316.9)、アミノ酸組成比: Ser; 2.69 (3), Glx;  
5.90 (6), Gly ; 1.00 (1), Ala; 1.99 (2), Leu; 2, Phe; 1.02 (1), Lys; 4.9  
7 (5), His; 0.99 (1), Arg; 1.98 (2), Pro; 3.87 (4)

#### 【0168】

化合物48. [Cys<sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]; 821.7 (理論値 821.1)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃  
、2時間加水分解後アミノ酸組成比: Ser; 0.60 (2), Gly ; 1.08 (1), Leu; 1,  
Phe; 1.06 (1), Pro; 0.96 (1)

#### 【0169】

化合物49. [Cys<sup>3</sup> (Octyl), <sup>D</sup>Phe<sup>4</sup>]-Ghrelin(1-7)-amide

ESI-MS [M+H]; 821.6 (理論値 821.1)、プロピオン酸・塩酸(50/50)で150℃  
、2時間加水分解後のアミノ酸組成比: Ser; 0.58 (2), Gly ; 1.02 (1), Leu; 1  
、Phe; 1.06 (1), Pro; 0.97 (1)

#### 【0170】

実施例11 グレリン誘導体ペプチド系化合物の活性比較

実施例10において合成したグレリン誘導体ペプチド系化合物および天然型グレ  
リンペプチドについて、実施例1に示した方法によってCa上昇活性を測定した。

#### 【0171】

(1) 3位セリン側鎖の修飾

グレリンの著しい構造上の特徴は3位セリン水酸基のオクタノイル基である。

まず、オクタノイル化されるセリンの位置が3位であることが活性発現に必須かどうかを調べた。ラットGSHレセプターを発現させたCHO細胞を用い、細胞内カルシウム上昇作用を指標とした。

その $EC_{50}$ 値が5.4 nMに保持された短鎖グレリン誘導体であるグレリン(1-9)アミドをもとに、[セリン<sup>2</sup>(オクタノイル), セリン<sup>3</sup>]-グレリン(1-9)アミド、[セリン<sup>2</sup>(オクタノイル)]-グレリン(1-9)アミド、および[N $\alpha$ -オクタノイル, セリン<sup>3</sup>]-グレリン(1-9)アミドを合成し、細胞内カルシウム上昇活性を検討した。

なお、短鎖誘導体に関しては、3項で詳述する。

### 【0172】

#### イ. 脂肪酸鎖長

ラットグレリン3位セリン側鎖のオクタノイル基を除去したデスーオクタノイル体の細胞内カルシウム上昇活性はオクタノイル体の2.6 nMから3,500 nMに低下することから、3位セリン側鎖のオクタノイル基は活性発現に極めて重要な役割を果たしていることは明らかである。

そこで、種々の飽和脂肪酸を用い、ラットグレリンにおけるセリン側鎖アシル基の炭素数と活性の関係を調べた。即ち、アセチル基( $CH_3CO-$ )、プロピオニル基( $CH_3CH_2CO-$ )、ブチリル基( $CH_3(CH_2)_2CO-$ )、ヘキサノイル基( $CH_3(CH_2)_4CO-$ )、デカノイル基( $CH_3(CH_2)_8CO-$ )、ラウロイル基( $CH_3(CH_2)_{10}CO-$ )、及びバルミトイル基( $CH_3(CH_2)_{14}CO-$ )で3位セリン水酸基をアシル化したグレリン誘導体の細胞内カルシウム上昇活性を求めた。

### 【0173】

#### ウ. 種々のアシル基置換

飽和脂肪酸に替え、フェニルプロピオン酸( $HO-CO-CH_2CH_2Ph$ )を芳香族脂肪酸の代表例として3位セリン水酸基にエステル結合させたヒトグレリン誘導体、および不飽和脂肪酸の代表例として3-オクテン酸( $-CH_3(CH_2)_3CH=CHCH_2COOH$ )をエステル結合させたヒトグレリン誘導体を作成し活性を評価した。

## エーテルアルキル基への置換

化学的に不安定なエステル結合をより安定なエーテル、チオエーテル結合などに変換すれば化学的に安定なグレリン誘導体の作成が可能である。しかしながら、活性が保持されることが前提であることは言うまでもない。そこで、ヒトグレリンの3位セリンをオクチル ( $C_8H_{17}$ ) 化したヒトグレリンのエーテル誘導体、およびラットグレリンの3位セリンをシステインに置換し、同様にオクチル化したラットグレリンのチオエーテル体の活性を調べた。

## 【0175】

結果を表4にまとめた。

グレリン誘導体の活性 1

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
1. human Ghrelin GSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.3
2. rat Ghrelin GSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1.5
3. Ghrelin(1-9)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	5.4
4. [Ser <sup>2</sup> (Octanoyl) , Ser <sup>3</sup> ]-Ghrelin(1-9)-amide H-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	1,100
5. [Ser <sup>2</sup> (Octanoyl) ]-Ghrelin(1-9)-amide H-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	1,400
6. [N-Octanoyl, Ser <sup>3</sup> ]-Ghrelin(1-9)-amide C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> CO-Gly-Leu-Ser-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-NH <sub>2</sub>	>10,000
7. [Ser <sup>3</sup> ]-rat Ghrelin GSSFLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	3,500
8. [Ser <sup>3</sup> (Acetyl) ]-rGhrelin GSS(CO-CH <sub>3</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	n t
9. [Ser <sup>3</sup> (Propionyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	n t
10. [Ser <sup>3</sup> (Butyryl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	280
11. [Ser <sup>3</sup> (Hexanoyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	16
12. [Ser <sup>3</sup> (Decanoyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>10</sub> H <sub>21</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	1.7
13. [Ser <sup>3</sup> (Lauroyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	2.4
14. [Ser <sup>3</sup> (Palmitoyl) ]-rGhrelin GSS(CO-C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	6.5
15. [Ser <sup>3</sup> (3-Phenylpropionyl) ]-hGhrelin GSS(CO-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> Ph)FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.4
16. [Ser <sup>3</sup> (3-Octenoyl) ]-hGhrelin GSS(CO-CH <sub>2</sub> CH=CH(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.7
17. [Ser <sup>3</sup> (Octyl) ]-hGhrelin GSS(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )FLSPEHQRVQQRKESKKPPAKLQPR	1.2
18. [Cys <sup>3</sup> (Octyl) ]-rGhrelin GSC(C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	5.4

表中、n t は試験を行っていないことを示す。

【0176】

ヒトグレリンのオクタノイル基を3位から2位セリンに移すと活性は約1/200に低下した (EC<sub>50</sub>=1,100 nM)。

また、アミノ末端アミノ基のみをN-オクタノイル化すると活性は比較的弱くなった (EC<sub>50</sub>>10,000 nM)。

これらの結果から、オクタノイル基で修飾されたアミノ酸の位置はグレリン分子において厳密に規定されていることが判明した。

#### 【0177】

脂肪酸鎖長の活性への影響は、ブタノイル基 (C4) でEC<sub>50</sub>が280 nMと顕著となり、ヘキサノイル基 (EC<sub>50</sub>=16 nM) でさらに上昇し、オクタノイル基 (グレリン) で1.5 nMとピークに達した。デカノイル基 (C10) でも活性はグレリンと同等の1.7 nMに保持され、さらにラウロイル基 (C12) で2.4 nM、パルミトイル基 (C16) でも6.5 nMと脂肪酸鎖長を延ばしても活性が保持された。

また、不飽和脂肪酸である3-オクテノイル基を導入しても、オクタノイル基と同等の活性 (EC<sub>50</sub>=1.7 nM) であった。

興味深いことにフェニルプロピオニル基の導入でも、EC<sub>50</sub>=1.4 nMと活性が保持されたことより、3位セリン側鎖のアシル基は必ずしも直鎖アルカノイル基である必要はなく、アルケノニル基、あるいはアリーラルアルカニル基、例えば、フェニルプロピオニル基以外の、ベンゾイル、フェナセチル、フェニルブチリル、ナフトイル、ナフチルアセチル基、ナフチルプロピオニル基等からも選択される。

#### 【0178】

さらに、化学的安定性が期待できる3位セリン、あるいはシステインをオクチル化したエーテルおよびチオエーテル体のEC<sub>50</sub>値が、それぞれ1.2 nM、5.4 nMに保持されたことより、3位アミノ酸残基側鎖は必ずしもアシル基である必要はないことが明らかになった。

活性を示すアシル基は多様であったことから、3位セリン水酸基、あるいは3位システインメルカプト基に直鎖、あるいは分枝アルキル基やアルケニル基、あるいはアラルキル基、例えばベンジル、フェネチル、フェニルプロピル、フェニルブチル、フェニルペンチル、ナフチルメチル基等が結合しても活性が維持され

したがって、3 位に選ばれるアミノ酸残基は、側鎖にアシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラルキル基で修飾が可能な官能基を有する、セリン、ホモセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アジピン酸、リジン、オルニチンなど、およびこれらのN-メチルアミノ酸のいずれかが好ましい。

これらのアミノ酸側鎖に、カルバメート、チオカルバメート、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテル、あるいはチオエステル結合を介し、アシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラルキル基が結合する。また、3 位アミノ酸の $\alpha$ 炭素にアルキル、アラルキル基が結合してもよい。

### 【0179】

また、3 位のアミノ酸残基は、側鎖に疎水性を有するロイシン、バリン、ノルイソロイシン、ホモロイシン、ホモイソロイシン、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニン等、あるいは、これらのN-メチルアミノ酸のいずれかから選択される。また、3 位のアミノ酸残基は、上記アミノ酸のL-体、D-体のいずれかからも選択される。

### 【0180】

#### (2) 活性領域の検索

カルボキシル末端部を含むグレリン(16-28)に細胞内カルシウム上昇活性が比較的低い( $EC_{50} > 10,000$  nM)こと、一方で、アミノ末端部を含むヒトグレリン(1-15)とラットヒトグレリン(1-15)の $EC_{50}$ 値がそれぞれ7.0 nM、8.6 nMと活性が保持されたことから、グレリンの活性部位はアミノ末端部分に存在することが明らかとなった(表5)。

### 【0181】

## グレリン誘導体の活性 2

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
19. Ghrelin(16-28) H-Lys-Glu-Ser-Lys-Lys-Pro-pro-Ala-lysLeu-Gln-Pro-Arg-OH	>10,000
20. hGhrelin(1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-Val -Gln-Gln-Arg-OH	7.0
21. rGhrelin(1-15) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-Ala -Gln-Gln-Arg-OH	8.6
22. [des Gln <sup>14</sup> ]-rGhrerin GSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQKAQ_RKESKKPPAKLQPR	1.5

## 【0182】

また、グレリン(1-15)において、ヒト型とラット型の活性がほぼ同等であることから、11位と12位の残基(ヒトでは—アルギニル—バリル—、ラットでは—リジル—アラニル—)はこれらのアミノ酸でなくてもよい。

このようなヒトグレリン、あるいはラットグレリンで得られた構造活性相関の結果は、それぞれラットグレリン、あるいはヒトグレリンに適用できる。また、14位のグルタミンを除去した[デス—グルタミン<sup>14</sup>]-ラットグレリンに、ラットグレリンと等しい活性(EC<sub>50</sub>=1.5 nM)が認められたことより、グレリン分子の中央部のアミノ酸が欠損していてもよい。

## 【0183】

## (3) ペプチド鎖長とカルボキシル末端への塩基性基の導入

活性が比較的強くみられたグレリン(1-15)をもとに、適宜カルボキシル末端側アミノ酸残基を欠損させた類縁体を作成し活性を評価した。

カルボキシル末端がカルボン酸である短鎖誘導体とカルボキシル末端がアミド化された短鎖誘導体の活性を表6に示した。

## 【0184】



グレリン誘導体の活性 3

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
23. hGhrelin(1-11) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Arg-OH	15
24. rGhrelin(1-11) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-Lys-OH	15
25. Ghrelin(1-10) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	19
26. Ghrelin(1-9) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-OH	38
27. Ghrelin(1-8) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-OH	100
28. Ghrelin(1-8)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-NH <sub>2</sub>	13
29. Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	2.6
30. Ghrelin(1-6)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-NH <sub>2</sub>	4.8
31. Ghrelin(1-5) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-OH	68
32. Ghrelin(1-5)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-NH <sub>2</sub>	6.2
30. Ghrelin(1-4) H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-OH	480
33. Ghrelin(1-4)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-NH <sub>2</sub>	160
34. Ghrelin(1-3)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-NH <sub>2</sub>	>10,000

【0185】

グレリン(1-3)アミドの活性は比較的低かった(EC<sub>50</sub> >10,000 nM)。フェニルアラニンを延ばしたグレリン(1-4)ではEC<sub>50</sub>値が480 nM、そのカルボキシル末端アミド体が160 nMと活性が顕著となった。

さらにロイシンアミドを付加したグレリン(1-5)アミド体の活性は、(1-4)アミド体のさらに約26倍上昇し(EC<sub>50</sub>=6.2 nM)、天然品と同レベルの活

最も強い活性は、グレリン（1-7）アミド体においてみられ、その $EC_{50}$ 値は2.6 nMと天然品とほぼ同等であった。

以上の結果から、グレリン活性発現のために必須な構造的要因はアミノ末端部4残基の配列に集約されるが、5位にロイシンなどの残基が付加されることで、グレリン受容体への親和性、あるいはシグナルトランスダクションが劇的に向上する。

#### 【0186】

また、上記結果から明らかなように、カルボキシル末端カルボン酸をアミド化することにより活性が上昇する傾向がみられた。

例えば、グレリン（1-9）では、アミド化することで $EC_{50}$ 値が38 nMから5.4 nMと約7倍、グレリン（1-4）では $EC_{50}$ 値が480 nMから160 nMの約3倍に上昇した。また、グレリン（1-9）アミドの9位塩基性残基ヒスチジン残基を除去したグレリン（1-8）アミドでは、 $EC_{50}$ 値が5.4 nMから13 nMに低下し、一方で、酸性アミノ酸である8位グルタミン酸を除去したグレリン（1-7）アミドでは、逆に $EC_{50}$ 値が13 nMから2.6 nMに上昇した。

アミド化の効果の一つはカルボン酸の負電荷の中和であることを考えると、上記の結果は、短鎖誘導体においてカルボキシル末端アミノ酸の塩基性が活性上昇に大きく寄与することを示すものである。

#### 【0187】

この結果を踏まえ、高い活性が得られたグレリン（1-7）アミドを中心に、カルボキシル末端部に塩基性を付与した誘導体を作成し、活性を調べた。

結果を表7に示した。

#### 【0188】

## グレリン誘導体の活性 4

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
35. [Lys <sup>8</sup> ]-Ghrelin(1-8)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Lys-NH <sub>2</sub>	1.1
36. [Arg <sup>8</sup> ]-Ghrelin(1-8)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Arg-NH <sub>2</sub>	1.1
37. [Lys <sup>6</sup> ]-Ghrelin(1-6)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Lys-NH <sub>2</sub>	12
38. [Lys <sup>5</sup> ]-Ghrelin(1-5)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	10
39. [ <sup>D</sup> Phe <sup>4</sup> , Lys <sup>5</sup> ]-Ghrelin(1-5)-amide H-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Lys-NH <sub>2</sub>	1,700

## 【0189】

グレリン(1-5)のカルボキシル末端部にリジンを導入した[リジン<sup>6</sup>]-グレリン(1-6)アミドのEC<sub>50</sub>値は、4.8 nMから12 nMへ若干低下したが、グレリン(1-4)では、カルボキシル末端にリジンを付加することで、EC<sub>50</sub>値が480 nMから10 nMへと約50倍上昇した。また、グレリン(1-7)のカルボキシル末端部にアルギニンあるいはリジンを付加したアミド誘導体の活性は、グレリン(1-7)アミド(EC<sub>50</sub>=2.6 nM)と比べ、いずれも1.1 nMと極めて強い細胞内カルシウム上昇活性を示した。

以上、ほとんどのケースにおいて、カルボキシル末端部における酸性のマスクングおよび塩基性基を導入することで、活性が上昇することが明らかになった。

## 【0190】

本実施例では、塩基性アミノ酸としてアルギニンアミドとリジンアミドを代表例として用いたが、塩基性を付与する目的からすると、ヒスチジンなどの他の塩基性アミノ酸を用いてもよく、付加するアミノ酸はD-体、L-体あるいはラセミ体のいずれであってもよい。また、D-体、L-体あるいはラセミ体、いずれかのN-メチルアミノ酸であってもよい。

カルボキシル末端カルボン酸の酸性をマスクする目的からすると、カルボキシル末端カルボン酸アミドも対応するメチルアミド、エチルアミド等のアルキルア

ニドであってよく、あるいはベンジルアミド、アダマンタンアミド、アダマンタンアルキルアミド等のアラルキルアミドでも同様の効果が得られることが推測される。あるいは、さらに塩基性を上昇させるために、アルキルアミドあるいはアラルキルアミドにアミノ基、グアニジド基などの塩基性基を結合させるのも好ましい。例えば、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{NHCH}_3$ 、 $-\text{CONH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$ 、 $-\text{CONHCH}_2\text{Ph}-\text{NH}_2$ などが挙げられる。

#### 【0191】

#### (4) アミノ末端グリシンと2位セリン残基

前述のように、オクタノイル基の位置は3位セリン水酸基上に厳密に規定されている。この位置がグレリン分子のどの官能基を基点にしているのかを検証した。即ち、活性が認められたグレリン(1-7)アミド( $\text{EC}_{50}=2.6 \text{ nM}$ )、あるいはグレリン(1-9)アミド( $\text{EC}_{50}=5.4 \text{ nM}$ )をもとに、アミノ末端グリシンと2位セリンの活性への影響を調べた。

結果を表8にまとめた。

#### 【0192】

グレリン誘導体の活性 5.

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
40. [N-Aminopentanoyl]-Ghrelin(3-7)-amide NH <sub>2</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CO-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	3.4
41. [N-Acetyl]-Ghrelin(1-10) CH <sub>3</sub> CO-Gly-Ser-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-Glu-His-Gln-OH	>10,000
42. [N-Tyr]-rGhrelin YGSS(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )FLSPEHQKAQQRKESKKPPAKLQPR	120
43. [N-Glycyl]-Ghrelin(3-7)-amide H-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	380
44. [Leu <sup>3</sup> ]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Leu-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	42
45. [His <sup>3</sup> ]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-His-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	35
46. [Lys <sup>3</sup> ]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Lys-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	24
47. [Gly <sup>3</sup> ]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Gly-Ser(CO-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	78

【0193】

アミノ末端のアミノ基をブロックしたN<sup>α</sup>-アセチル-グレリン(1-10)の活性が比較的弱くなった。(EC<sub>50</sub>>10,000 nM)。また前述したように、[N<sup>α</sup>-オクタノイル,セリン<sup>3</sup>]-グレリン(1-9)アミドの活性も比較的弱くなったことから(EC<sub>50</sub>>10,000 nM)、アミノ末端のアミノ基がブロックされていないことが活性発現において好ましい。

一方で、アミノ末端のグリシンと2位セリンを、それら2残基長に相当する5-アミノ-nペンタン酸(NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-CO-)で置換した、N<sup>α</sup>-アミノペンタノイル-グレリン(3-7)アミドの活性はほぼ保持されたこと(EC<sub>50</sub>=3.4 nM)、および2位セリンを欠損させた[N<sup>α</sup>-グリシル]-グレリン(3-7)アミドの活性が低下すること(EC<sub>50</sub>=380 nM)、アミノ末端にチロシン残基を付与した[N-チロシル]-ラットグレリンの活性が120 nMに低下することなどから、より強い活性を得るために好ましいアミノ末端アミノ基の位置は、3位のオクタノイルセリン残基から近くても離れても良くなく、アミノ酸残基で、2残基相当分、アミ

【0194】

また、グレリン（1-7）アミドにおいて、2位セリンをロイシン、グリシン、ヒスチジン、リジンに置換した誘導体のEC<sub>50</sub>値は、それぞれ42 nM、78 nM、24 nM、35 nMとなり、グレリン（1-7）アミドと比べ、活性がやや低下した。本結果から2位アミノ酸の役割を解釈するのは難しいが、セリン残基；-NH-CH(CH<sub>2</sub>OH)-CO-がアミノペンタン酸の部分構造-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-に置き換えられることから、少なくとも2位セリン残基はグレリンアミノ末端のアミノ基を3位オクタノイル基から一定の距離を保つスペーサー的な役割を果たしていると考えられる。また、5-アミノペンタン酸の置換で活性が保持されたのは、アルキルアミン構造の導入によってアミノ末端の塩基性が上昇した結果とも考えられる。

【0195】

以上まとめると、アミノ末端部のグリシン残基はそのアミノ基をもって、グレリン分子のアミノ末端に塩基性を与え、グレリンの活性を発現せしめていると考えられるため、アミノ末端部のアミノ基はブロックされていないことが好ましい。

また2位セリン残基はアミノ末端アミノ基を3位オクタノイル基から一定の距離を保つスペーサー的な役割を果たしていると考えられるため、アミノ末端アミノ基はいずれのアミノ酸を用いてよいが、好ましくは、比較的嵩の小さい側鎖を有するアミノ酸や非アミノ酸構造で置き換えてもよい。即ち、グレリン分子においてアミノ末端アミノ基を基点にオクタノイル基の位置が規定されており、この位置関係がグレリン活性構造の一部を形成しているものと考えられる。

【0196】

すなわち、2位アミノ酸側鎖は嵩高い構造よりは、むしろセリン、アラニン、ノルバリンのように、側鎖が比較的小さく、近隣残基の自由度を束縛しないアミノ酸残基が好ましいと考えられる。加えて、N<sup>α</sup>-アミノペンタノイル-グレリン（3-7）アミドの活性が、ほぼ保持された（3.4 nM）ことから、2位セリンは非アミノ酸構造に置換可能である。

グレリン分子のアミノ末端のアミノ酸は、塩基性を導入する目的から、α-ア

択される。2位はセリン以外のアミノ酸でもよく、好ましくは比較的小さな側鎖を有するアラニン、セリン、ノルバリン、あるいは非アミノ酸構造から選択される。また、アミノ末端のグリシンと2位セリンは、これら2残基に相当するδ-アミノ酸、例えば実施例で示した5-アミノペンタン酸以外にも、5-アミノ-5-ジメチルペンタン酸、2,5-アミノペンタン酸等で置換が可能である。

【 0 1 9 7 】

(5) 3 位、および 4 位アミノ酸残基の光学活性

グレリン (1-7) アミドの構造をもとに、3 位セリンと 4 位フェニルアラニンをそれぞれ L- 体から D- 体に変換した誘導体を作成し、3 位と 4 位アミノ酸の光学活性の活性に及ぼす影響を検討した。具体的には、良好な活性が保持された [セリン<sup>3</sup> (オクチル)]-グレリン (1-7) アミド ( $EC_{50}=5.8$  nM)、あるいは [システイン<sup>3</sup> (オクチル)]-グレリン (1-7) アミド ( $EC_{50}=7.4$  nM) をもとに 3 位セリンと 4 位フェニルアラニンを、それぞれ対応する L- 体、D- 体に置き換えた誘導体を作成した。

結果を表 9 にまとめた。

【0198】

## グレリン誘導体の活性 6

化合物 構造	Ca 上昇活性 EC <sub>50</sub> (nM)
48. [Cys <sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Cys (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	7.4
49. [Cys <sup>3</sup> (Octyl), <sup>D</sup> Phe <sup>4</sup> ]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Cys (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	3,000
50. [Ser <sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Ser (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	5.8
51. [Ser <sup>3</sup> (Octyl), <sup>D</sup> Phe <sup>4</sup> ]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser-Ser (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	2,200
52. [ <sup>D</sup> Ser <sup>3</sup> (Octyl)]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser- <sup>D</sup> Ser (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )-Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	>10,000
53. [ <sup>D</sup> Ser <sup>3</sup> (Octyl), <sup>D</sup> Phe <sup>4</sup> ]-Ghrelin(1-7)-amide H-Gly-Ser- <sup>D</sup> Ser (C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> )- <sup>D</sup> Phe-Leu-Ser-Pro-NH <sub>2</sub>	>10,000

## 【0199】

3位と4位のアミノ酸はL-体、D-体いずれでもよく、そのいずれの組み合わせから選択される。3位アミノ酸がL-体で、4位フェニルアラニンがL-体、D-体のいずれであることが好ましい。特に3位と4位がともにL-体の場合であることがより好ましい。また、酵素分解を防ぐために、N-メチルアミノ酸であってもよい。

## 【0200】

具体的には、側鎖に疎水性を有するロイシン、バリン、ノルイソロイシン、ホモロイシン、ホモイソロイシン、ナフチルアラニン類、トリプトファン、フェニルアラニン、シクロヘキシルアラニンなど、あるいは、これらのN-メチルアミノ酸が好ましい。

## 【0201】

さらに3位と4位に選ばれるアミノ酸残基は、側鎖にアシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラルキル基で修飾が可能な官能基を有する、セリン、ホモセリン、スレオニン、システイン、ホモシステイン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アジピン酸、リジン、オルニチンなども好ましい。

これらの側鎖に反応性を有するアミノ酸はD-体、L-体いずれでもよく、D



—あるいはL-N-メチルアミノ酸であってもよい。なかでも、3位がL-体であるいは3, 4位ともL-体の組み合わせが好ましい。

アミノ酸側鎖に、エステル、アミド、ジスルフィド、エーテル、チオエーテル、あるいはチオエステル結合を介し、アシル基、アルキル基、アルケニル基あるいはアラルキル基が結合する。また、結合を介さずに、3位と4位の $\alpha$ 炭素にアルキル、又はアラルキル基などが結合してもよい。

## 【0202】

### 実施例12 グレリン誘導体のラットにおけるGH放出活性

麻酔下のWister系ラット雄に、化合物18; [Cys(Octyl)]-rat Ghrelinを $5\mu\text{g}$ /head静脈内投与したときの、血中に放出されるGHを測定した。コントロールとして生理食塩水、およびrat Ghrelin ( $5\mu\text{g}$ /head) を投与し、本品と比較した。

より具体的には、ペントバルビタールで麻酔した摂餌後のWister系ラット雄（約250 g）に、化合物18; [Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rat Ghrelin を $5\mu\text{g}$ /head静脈内投与した（n=5）。比較例として生理食塩水（n=5）、およびrat Ghrelinを $5\mu\text{g}$ /head投与した（n=5）。投与前、および投与後5, 10, 15, 20, 30, 60分に股動脈カニューレより採血し、血漿中のGH濃度をラジオイムノアッセイ法（Biotrak/Amersham社）にて測定した。

表5～7に示すように、[Cys<sup>3</sup>(Octyl)]-rat GhrelinのGH分泌促進活性は、分泌されたGHのC<sub>max</sub>が天然型ラットグレリンと同等（ともに約1,100 ng/ml）であり、さらに分泌時間を延長させる傾向を示した。本品の細胞内Ca上昇活性はEC<sub>50</sub>値で5.4 nMであった。

## 【0203】

[Cys(C18)<sup>3</sup>]-ラットグレリン (化合物18) のGH放出活性

[Cys(C18) <sup>3</sup> ]-ラットグレリン 5 μg/head	時間 (分)						
	0	5	10	15	20	30	60
血漿中GH濃度 (ng/ml)	377	338	687	927	900	469	98
1	101	294	258	300	358	245	86
2	59	476	949	1229	1417	704	133
3	33	530	959	1451	1299	800	220
4	32	613	1060	1561	1359	726	122
5							
Mean	120	450	783	1093	1067	589	132
S.D.	146	133	324	506	445	229	53

【 0 2 0 4 】

【表 1 1】

## 生理食塩液のGH放出活性

生理食塩液	時間 (分)						
	0	5	10	15	20	30	60
血漿中GH濃度 (ng/ml)	0	88	129	133	116	107	430
1							
2	204	122	118	134	128	69	36
3	77	0	0	0	0	0	11
4	0	0	0	0	48	27	110
5	0	0	0	0	0	0	210
Mean	56	42	49	53	58	41	159
S.D.	89	58	67	73	61	47	170

【 0 2 0 5 】

ラットグレリンのGH放出活性

ラットグレリン 5 $\mu$ g/head	時間 (分)						
	0	5	10	15	20	30	60
血漿中GH濃度 (ng/ml)	143	186	425	405	215	56	3
1	10	1396	2028	1566	876	242	27
2	838	163	443	681	419	120	36
3	348	556	1387	1469	1293	663	100
4	0	875	1380	1009	1414	452	20
5							
Mean	268	635	1133	1026	843	306	37
S.D.	348	517	690	498	525	250	37

【0206】

【発明の効果】

本発明の新ペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩は、人又は動物に投与することによってGHの分泌を誘導し、実質的な副作用を伴うことなく、小児の成長促進及び成人のGH欠乏により代謝機能の欠損を改善する医薬として、そしてその抗体はGH欠乏により疾病の診断にさらには学術分野の研究ツールとして優れた作用効果を奏する。

【0207】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Kangawa, Kenji  
<120> New Peptides  
<130>  
<150> JP 11-210002  
<151> 1999-7-23  
<160> 7  
<210> 1

<211> /  
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>1

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro

1 5

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>2

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>3

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys

1 5 10 15

Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;223&gt; Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;4

Met	Val	Ser	Ser	Ala	Thr	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Met	Leu
1				5					10					15	
Trp	Met	Asp	Met	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His
			20					25					30		
Gln	Lys	Ala	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Pro	Ala	Lys	Leu
		35					40					45			
Gln	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	His	Pro	Glu	Asp	Arg	Gly	Gln
	50					55					60				
Ala	Glu	Glu	Ala	Glu	Glu	Glu	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro	Phe
65					70				75					80	
Asp	Val	Gly	Ile	Lys	Leu	Ser	Gly	Ala	Gln	Tyr	Gln	Gln	His	Gly	Arg
				85					90					95	
Ala	Leu	Gly	Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu	Glu	Val	Lys	Glu
			100					105						110	
Ala	Pro	Ala	Asn	Lys											
			115												

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides of

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu  
1 5 10 15  
Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His  
20 25 30  
Gln Arg Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu  
35 40 45  
Gln Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln  
50 55 60  
Ala Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe  
65 70 75 80  
Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln  
85 90 95  
Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu  
100 105 110  
Ala Pro Ala Asp Lys  
115

<210> 6

<211> 501

<212> cDNA

<213> Rattus norvegicus

<220>

<221> CDS

<222> (31).... (381)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of rat endogenous peptide  
s of growth hormone secretagogue

<400>6

tccagatcat ctgtcctcac caccaaggcc atg gtg tct tca gcg act

48

atc tgc agt ttg cta ctc ctc agc atg ctc tgg atg gac atg gcc atg 96  
 Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu Trp Met Asp Met Ala Met  
           10                          15                          20  
 gca ggt tcc agc ttc ttg agc cca gag cac cag aaa gcc cag cag aga 144  
 Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Gln Arg  
           25                          30                          35  
 aag gaa tcc aag aag cca cca gct aaa ctg cag cca cga gct ctg gaa 192  
 Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu Glu  
           40                          45                          50  
 ggc tgg ctc cac cca gag gac aga gga caa gca gaa gag gca gag gag 240  
 Gly Trp Leu His Pro Glu Asp Arg Gly Gln Ala Glu Glu Ala Glu Glu  
           55                          60                          65                          70  
 gag ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag ctg 288  
 Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu  
                           75                          80                          85  
 tca gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt 336  
 Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu  
                           90                          95                          100  
 cag gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag 381  
 Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys  
                           105                          110                          115  
 taaccactga caggactggt ccctgtactt tcttcctaag caagaactca catccagctt 441  
 ctgcctcctc tgcaactccc agcactctcc tgctgactta caaataaatg ttcaagctgt 501

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 511

&lt;212&gt; DNA

&lt;220&gt;

<222> (34).... (385)

<213> Homo sapiens

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>7

```
gcaggccac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca      45
                               Met Pro Ser Pro
                               1
ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg      93
Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu
   5              10              15              20
gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag      141
Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln
              25              30              35
cag aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct      189
Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala
              40              45              50
cta gca ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca      237
Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala
              55              60              65
gag gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc      285
Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile
              70              75              80
aag ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag      333
Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys
              85              90              95              100
ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac      381
Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp
```



aag tgaatgctta caagccttac tcactctctt ctaagtttag aagcgctcat

434

Lys

ctggccttttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga 494

ataaatgttc aaactgt 511

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;8

Gly Ser Ser Phe

1

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Amino acid sequence for a core region of endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;9

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln

1

5

10

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400>10

Printed: 02-08-2002

PRIDOC-X

00946453-JP00049

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 11

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for human endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 11

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu

1 5 10 15

Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg

20 25

<210> 12

<211> 116

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<223> Amino acid sequence for a prepro-form of rat endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 12

Met Val Ser Ser Ala Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu Ser Met Leu

1 5 10 15

Trp Met Asp Met Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His

20 25 30

Gln Lys Ala Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln

35 40 45

50 55 60  
Glu Glu Ala Glu Glu Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp  
65 70 75 80  
Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala  
85 90 95  
Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala  
100 105 110

Pro Ala Asn Lys  
115

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Amino acid sequence for prepro-form of human endogenous peptides of  
growth hormone secretagogue

<400> 13

Met Pro Ser Pro Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu  
1 5 10 15  
Trp Leu Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His  
20 25 30  
Gln Arg Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln  
35 40 45  
Pro Arg Ala Leu Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala  
50 55 60  
Glu Gly Ala Glu Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp  
65 70 75 80  
Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala  
85 90 95

115

70

ctg gaa atc agg ttc aat gct ccc ttc gat gtt ggc atc aag cta tca txx  
Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser

75 80 85

gga gct cag tac cag cag cat ggc cgg gcc ctg gga aag ttt ctt cag 336  
Gly Ala Gln Tyr Gln Gln His Gly Arg Ala Leu Gly Lys Phe Leu Gln

90 95 100

gat atc ctc tgg gaa gag gtc aaa gag gcg cca gct aac aag 378  
Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Lys Glu Ala Pro Ala Asn Lys

105 110 115

taaccactga caggactggt ccctgtactt tcctcctaag caagaactca catccagctt 438  
ctgcctcctc tgcaactccc agcactctcc tgctgactta caaataaatg ttcaagctgt 498

<210> 15

<211> 508

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (34).... (381)

<213> Homo sapiens

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of human endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 15

gcaggcccac ctgtctgcaa cccagctgag gcc atg ccc tcc cca 45

Met Pro Ser Pro  
1

ggg acc gtc tgc agc ctc ctg ctc ctc ggc atg ctc tgg ctg gac ttg 93  
Gly Thr Val Cys Ser Leu Leu Leu Leu Gly Met Leu Trp Leu Asp Leu

5 10 15 20

gcc atg gca ggc tcc agc ttc ctg agc cct gaa cac cag aga gtc cag 141  
Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Arg Val Gln

aga aag gag tcg aag aag cca cca gcc aag ctg cag ccc cga gct cta 189  
 Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Pro Ala Lys Leu Gln Pro Arg Ala Leu  
 40 45 50  
 gca ggc tgg ctc cgc ccg gaa gat gga ggt caa gca gaa ggg gca gag 237  
 Ala Gly Trp Leu Arg Pro Glu Asp Gly Gly Gln Ala Glu Gly Ala Glu  
 55 60 65  
 gat gaa ctg gaa gtc cgg ttc aac gcc ccc ttt gat gtt gga atc aag 285  
 Asp Glu Leu Glu Val Arg Phe Asn Ala Pro Phe Asp Val Gly Ile Lys  
 70 75 80  
 ctg tca ggg gtt cag tac cag cag cac agc cag gcc ctg ggg aag ttt 333  
 Leu Ser Gly Val Gln Tyr Gln Gln His Ser Gln Ala Leu Gly Lys Phe  
 85 90 95 100  
 ctt cag gac atc ctc tgg gaa gag gcc aaa gag gcc cca gcc gac aag 381  
 Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Ala Lys Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 105 110 115  
 tgatcgccca caagccttac tcacctctct ctaagtttag aagcgctcat 431  
 ctggcttttc gcttgcttct gcagcaactc ccacgactgt tgtacaagct caggaggcga 491  
 ataaatgttc aaactgt 508

&lt;210&gt;-16

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

<223> Amino acid sequence for porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt;16

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys  
 1 5 10 15  
 Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for porcine endogenous peptides (27 amino acid s) of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 17

Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Lys	Val	Gln	Arg	Lys	Glu
1				5					10					15	
Ser	Lys	Lys	Pro	Ala	Ala	Lys	Leu	Lys	Pro	Arg					
			20					25							

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sus scrofa (pig)

&lt;223&gt; Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

&lt;400&gt; 18

Met	Pro	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Cys	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	Leu
1				5					10					15	
Leu	Met	Ala	Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu
			20					25					30		
His	Gln	Lys	Val	Gln	Gln	Arg	Lys	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Ala	Ala	Lys
		35					40					45			
Leu	Lys	Pro	Arg	Ala	Leu	Glu	Gly	Trp	Leu	Gly	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly
	50					55				60					
Glu	Val	Glu	Gly	Thr	Glu	Asp	Lys	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Pro
65					70					75					80

85 90 95  
 Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr  
 100 105 110

Glu Ala Pro Ala Asp Lys  
 115

<210> 19

<211> 117

<212> PRT

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Amino acid sequence for prepro-form of porcine endogenous peptides  
 (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 19

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Ser Val Leu  
 1 5 10 15

Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu  
 20 25 30

His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala Ala Lys Leu  
 35 40 45

Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp Ser Gly Glu  
 50 55 60

Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Pro Cys  
 65 70 75 80

Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln His Gly Gln  
 85 90 95

Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu Val Thr Glu  
 100 105 110

Ala Pro Ala Asp Lys  
 115



<211> 494

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (9).... (362)

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400> 20

ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc	47
Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu	
1 5 10	
agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg	95
Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu	
15 20 25	
agc ccc gaa cac cag aaa gtg cag cag aga aag gag tcc aag aag cca	143
Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro	
30 35 40 45	
gca gcc aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa	191
Ala Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu	
50 55 60	
gac agt ggt gag gtg gaa ggc acg gag gac aag ctg gaa atc cgg ttc	239
Asp Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe	
65 70 75	
aac gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac	287
Asn Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp	
80 85 90	
cag cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa	335

gag gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc 382

Glu Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys

110 105

cacctctgtt ctcccagcct cctaagggct cacctggcct ccaggacgct tccactatca 442

caccagctc tgagggatgc tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg 494

<210> 21

<211> 491

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (9).... (359)

<213> Sus scrofa (pig)

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of porcine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 21

ctgaggcc atg ccc tcc acg ggg acc att tgc agc ctg ctg ctc ctc 47

Met Pro Ser Thr Gly Thr Ile Cys Ser Leu Leu Leu Leu

1 5 10

agc gtg ctc ctc atg gca gac ttg gcc atg gcg ggc tcc agc ttc ttg 95

Ser Val Leu Leu Met Ala Asp Leu Ala Met Ala Gly Ser Ser Phe Leu

15 20 25

agc ccc gaa cac cag aaa gtg cag aga aag gag tcc aag aag cca gca 143

Ser Pro Glu His Gln Lys Val Gln Arg Lys Glu Ser Lys Lys Pro Ala

30 35 40 45

gcc aaa ctg aag ccc cgg gcc ctg gaa ggc tgg ctc ggc cca gaa gac 191

Ala Lys Leu Lys Pro Arg Ala Leu Glu Gly Trp Leu Gly Pro Glu Asp

50 55 60

Printed: 02-08-2002

PRIDOC-X

0094645

Ser Gly Glu Val Glu Gly Thr Glu Asp Lys Leu Glu Ile Arg Phe Asn

65

70

75

gcc ccc tgt gat gtt ggg atc aag ttg tca ggg gct cag tcc gac cag  
Ala Pro Cys Asp Val Gly Ile Lys Leu Ser Gly Ala Gln Ser Asp Gln

287.

80

85

90

cac ggc cag ccc ctg ggg aaa ttt ctc cag gac atc ctc tgg gaa gag  
His Gly Gln Pro Leu Gly Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu Glu

335

95

100

105

gtc act gag gcc ccg gcc gac aag tgattgtccc tgagaccagc  
Val Thr Glu Ala Pro Ala Asp Lys

379

110 115

c a c c t c t g t t c t c c c a g c c t c c t a a g g g c t c a c c t g g c t t c c a g g a c g c t t c c a c t a t c a

439

cacccagctc tgaggggatgc tagcctggga ggtgaataaa cattcagact gg

491

<210> 22

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; PRT

<213> Bos taurus

<223> Amino acid sequence for bovine endogenous peptides (27 amino acids)  
) of growth hormone secretagogue

<400> 22

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Glu His Gln Lys Leu Gln Arg Lys Glu

1

5

10

15

Ala Lys Lys Pro Ser Gly Arg Leu Lys Pro Arg

20

25

<210> 23

<211> 89

<212> PRT

<213> Bos taurus

<400> 23

Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Glu
1				5					10					15	
Leu	Gln	Arg	Lys	Glu	Ala	Lys	Lys	Pro	Ser	Gly	Arg	Leu	Lys	Pro	Arg
			20					25						30	
Thr	Leu	Glu	Gly	Gln	Phe	Asp	Phe	Glu	Val	Gly	Ser	Gln	Ala	Glu	Gly
			35					40						45	
Ala	Glu	Asp	Glu	Leu	Glu	Ile	Arg	Phe	Asn	Ala	Phe	Phe	Asn	Ile	Gly
			50					55						60	
Ile	Lys	Leu	Ala	Gly	Ala	Gln	Ser	Leu	Gln	His	Gly	Gln	Thr	Leu	Gly
			65					70						75	
Lys	Phe	Leu	Gln	Asp	Ile	Leu	Trp	Glu							
															85

<210> 24

<211> 267

<212> DNA

<220>

<221> CDS

<222> (1).... (267)

<213> Bos taurus

<223> Base sequence of cDNA coding prepro-form of bovine endogenous peptides (27 amino acids) of growth hormone secretagogue

<400> 24

gac	ttg	gcc	atg	gcg	ggc	tcc	agc	ttt	ctg	agc	ccc	gaa	cat	cag	gaa	48
Asp	Leu	Ala	Met	Ala	Gly	Ser	Ser	Phe	Leu	Ser	Pro	Glu	His	Gln	Glu	
1				5					10					15		
ctg	cag	aga	aag	gaa	gct	aag	aag	cca	tca	ggc	aga	ctg	aag	ccc	cgg	96

acc ctg gaa ggc cag ttt gac ccg gag gtg gga agt cag gcg gaa ggt 144  
 Thr Leu Glu Gly Gln Phe Asp Phe Glu Val Gly Ser Gln Ala Glu Gly

35 40 45

gca gag gac gag ctg gaa atc cgg ttc aac gcc ccc ttt aac att ggg 192  
 Ala Glu Asp Glu Leu Glu Ile Arg Phe Asn Ala Phe Phe Asn Ile Gly

50 55 60

atc aag cta gca ggg gct cag tcc ctc cag cat ggc cag acg ttg ggg 240  
 Ile Lys Leu Ala Gly Ala Gln Ser Leu Gln His Gly Gln Thr Leu Gly

65 70 75 80

aag ttt ctt cag gac atc ctc tgg gaa 267  
 Lys Phe Leu Gln Asp Ile Leu Trp Glu

85

<210> 25

<211> 24

<212> PRT

<213> Gallus domesticus

<223> Amino acid sequence for chicken endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>25

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Thr Tyr Lys Asn Ile Gln Gln Gln Lys  
 1 5 10 15

Gly Thr Arg Lys Pro Thr Ala Arg  
 20

<210> 26

<211> 21

<212> PRT

<213> Anguilla japonica

<400>26

Gly Ser Ser Phe Leu Ser Pro Ser Gln Arg Pro Gln Gly Lys Glu Lys

1 5 10 15

Lys Pro Pro Arg Val

20

<210> 27

<211> 28

<212> PRT

<213> Rana cafesbeiana

<223> Amino acid sequence for frog endogenous peptides of growth hormone secretagogue

<400>27

Gly Leu Ser Phe Leu Ser Pro Ala Glu Met Gln Lys Ile Ala Glu Arg

1 5 10 15

Gln Ser Gln Asn Lys Leu Arg His Gly Asn Met Arg

20

25

【0208】

【図面の簡単な説明】

【図 1】 図1は、グレリンのラット胃抽出物からの精製を示す図で、CHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の上昇による蛍光強度の変化は黒棒で示してある。aは、40 gラット胃より調製したSP-III画分のSepahdex G-50 (fine) によるゲル濾過の結果を示す図で、活性画分が分子量約3,000ダルトンであることを示している。bは、2回目のCM-イオン交換HPLCの結果を示す図で、55～56分に溶出される活性画分は、逆相HPLCでさらに精製した。

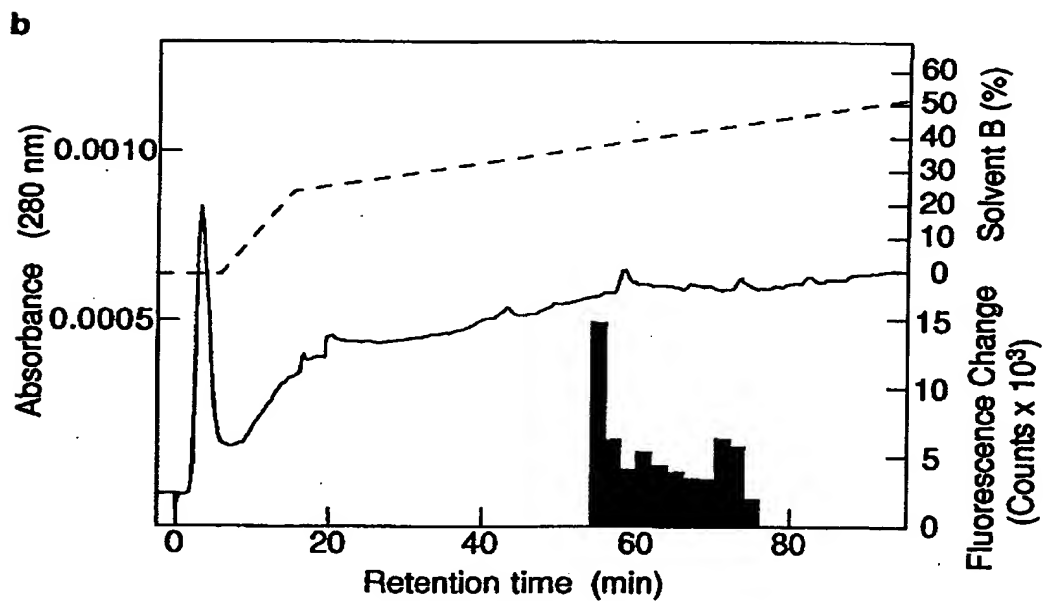
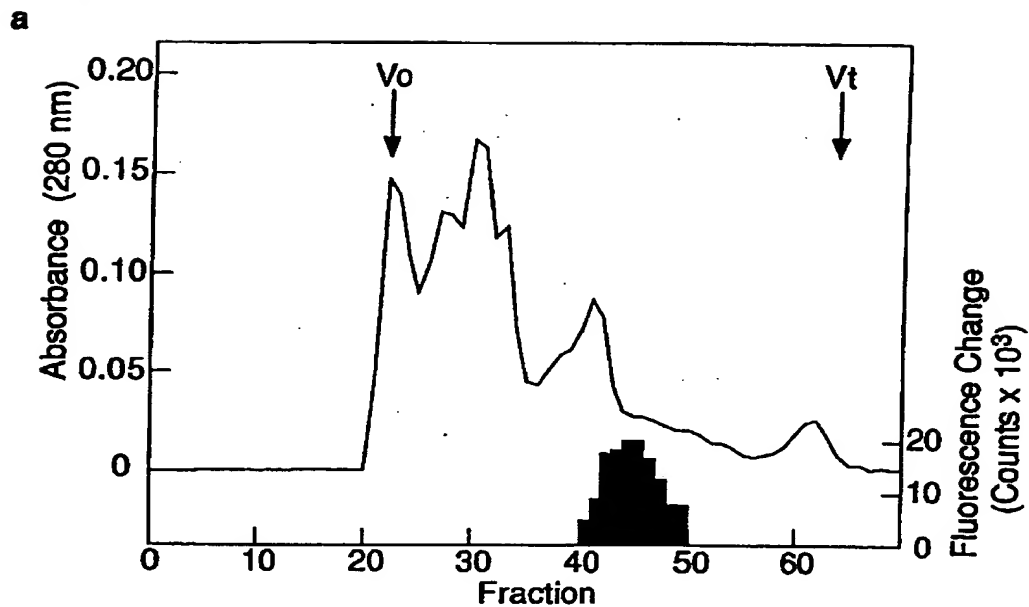
【図 2】 図2は、グレリンにおけるn-オクタノイル修飾を同定したことを示す。aは、天然型グレリン（上段）、及び合成グレリンと合成脱アシル化グレリン（下段）、各々2 μgを逆相HPLCで分析した結果を示す図である。bは、天然

加グレリン（実線）、合成グレリン（点線）及び合成脱アシルグレリン（破線）による、CHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示す図である。

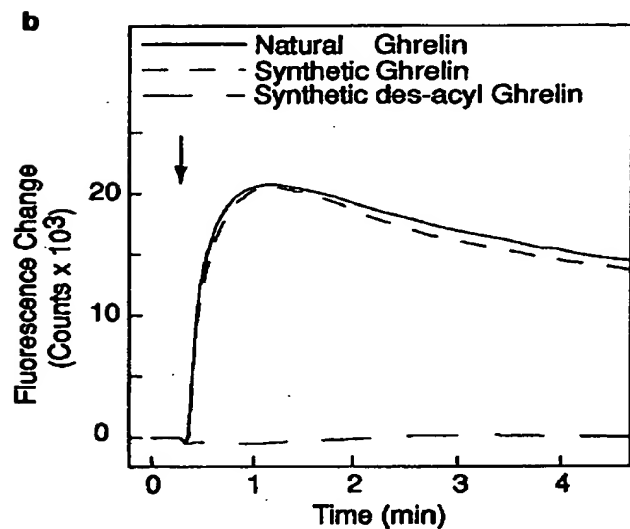
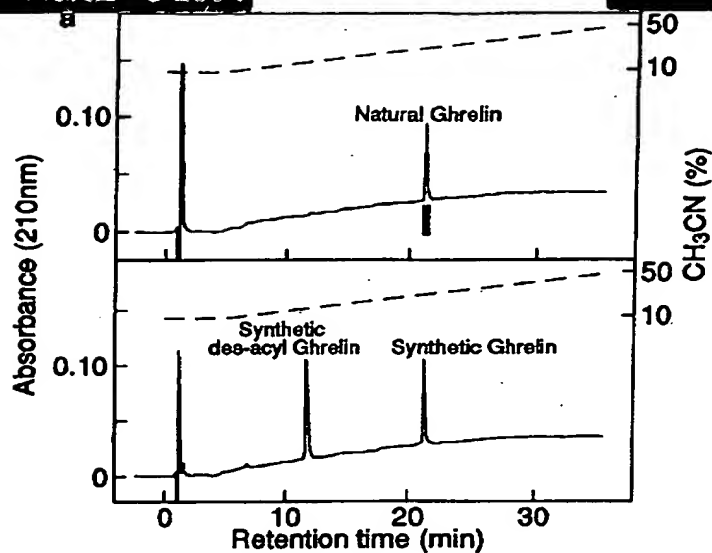
【図 3】 図3は、グレリンのCHO-GHSR62細胞に対する特異的な相互作用を示す図で、図中、矢印で示した点で試料を添加した。aは、グレリン、GHRP-6およびGRF（GHRH）によるCHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図である。bは、GHS-Rの特異的阻害剤である[D-Lys-3]-GRP-6を添加（○）あるいは非添加（●）時の、グレリンによるCHO-GHSR62細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化を示した図で、GRF（GHRH）による細胞内カルシウムイオン濃度の変化（黒三角）も示してある。

【図 4】 図4は、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列、およびこれら前駆体の各種組織での発現を調べた結果を示す図である。aは、ラットおよびヒト由来のグレリン前駆体のアミノ酸配列を比較した図で、図中、同一アミノ酸は網掛け、点線はシグナルペプチド、黒三角はシグナルペプチドの切断点、三角はカルボキシル末端側の切断点、ボックスは成熟型グレリン部分、\*はn-オクタン酸による修飾を示す。bは、ラット各種組織におけるグレリンの発現をノザンプロットによって解析した結果を示す図である。

【図 5】 図5は、in vitroおよびin vivoにおけるグレリンの下垂体ホルモン分泌に及ぼす効果を示す図である。aは、ラット下垂体初期培養細胞における細胞内カルシウムイオン濃度の変化による蛍光強度の変化を示した図で、実線はグレリン、破線は脱アシル化グレリンを添加した場合を示す。bは、グレリンによる下垂体ホルモンの分泌を示す図で、図中、黒棒はグレリン添加時、白棒はグレリン非添加時の下垂体ホルモン濃度を示す。cは、雄ラットにグレリンを静脈注射した後の血漿中の下垂体ホルモン濃度の経時変化を示す図である。図bおよび図c中で、GHは成長ホルモン、ACTHはアドレノコルティコトロピン、FSHはフォリクル、LHはルテナイジングホルモン、PRLはプロラクチン、TSHはチロイド促進ホルモンを表す。

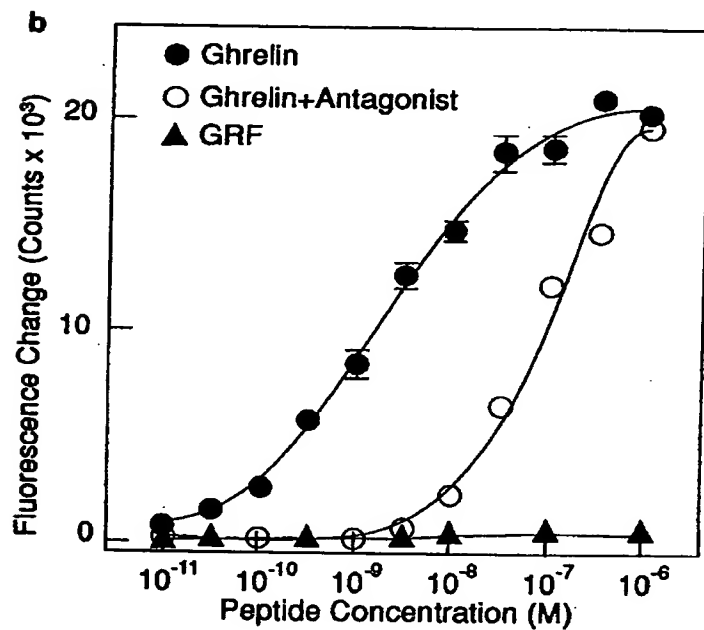
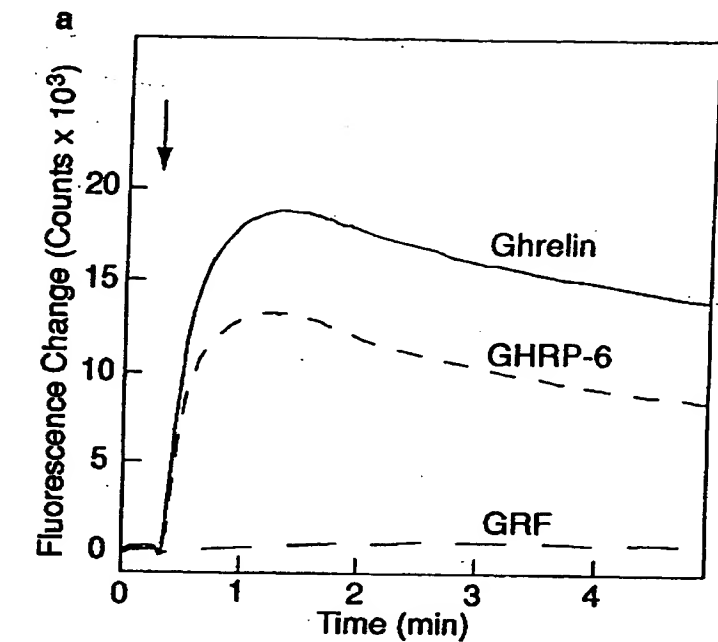






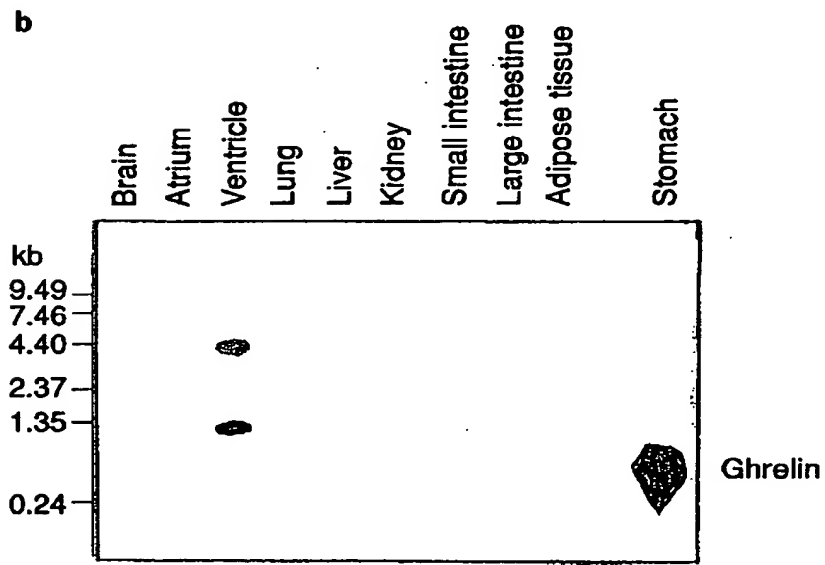
**c**

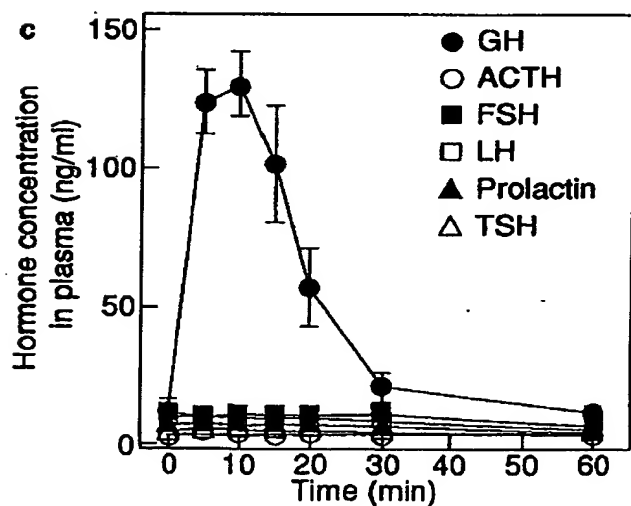
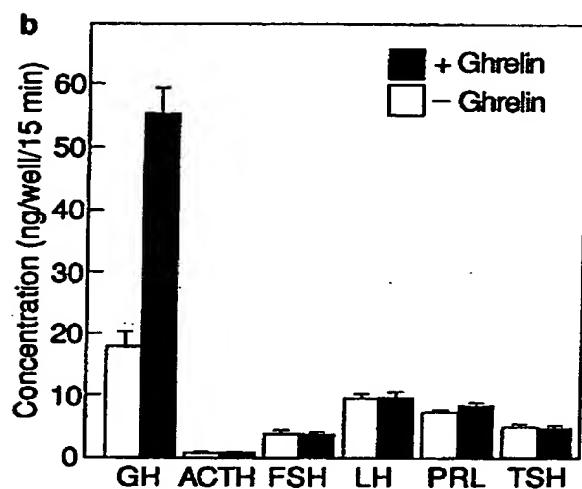
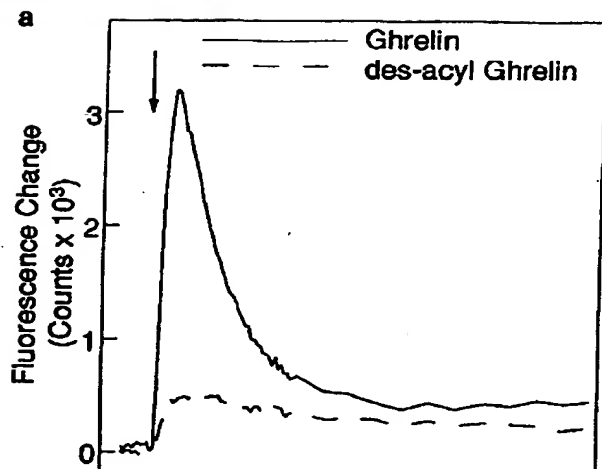




**a**

Human	1	MPSPGTVCSLLLLGMLWDLAMAGSSFLSP	30
Rat	1	MVSSATICSLLLLLSMLWMDMAMAGSSFLSP	30
Human	31	EHORVOORKESSKKPPAKLOPRALAGWL RPE	60
Rat	31	EHOKAQORKESSKKPPAKLOPRALEGWL HPE	60
Human	61	DGGQAE GA EDELEVRFNAPFDVGIKLSGVO	90
Rat	61	DRGQAEEAEEEELEIRFNAPFDVGIKLSGAQ	90
Human	91	YQQHSQALGKFLQDILWEEAKEAPADK	117
Rat	91	YQQHGRALGKFLQDILWEEVKEAPANK	117





【課題】 成長ホルモンの分泌を誘導する新規ペプチド系化合物を提供する。

【解決手段】 細胞内のカルシウムイオン濃度を上昇させる活性を有し、少なくとも一つのアミノ酸が修飾アミノ酸及び／又は非アミノ酸化合物により置換されたことを特徴とするペプチド系化合物又はその薬学的に許容される塩。

【選択図】 なし

【整理番号】 DS03J180

【提出日】 平成12年 6月 5日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成12年特許願第126623号

【補正をする者】

【識別番号】 593081475

【氏名又は名称】 寒川 賢治

【代理人】

【識別番号】 100077012

【弁理士】

【氏名又は名称】 岩谷 龍

【電話番号】 06-4796-1300

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 提出物件の目録

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【提出物件の目録】

【包括委任状番号】 0007532

【ブルーフの要否】 要

出願人 羅 麻

Printed:02-08-2002

P-PIODOC-X

00946458-JP000499

5 9 3 0 8 1 4 7 5

19990806

住所変更

5 9 9 1 0 4 0 9 3

大阪府箕面市小野原東 6 丁目 2 8 、 4 - 2 0 1 号

寒川 賢治

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**